



# **Tyrosinphosphorylierung als Regulator der Reifung von Rezeptortyrosinkinasen**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
**doctor rerum naturalium**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biochem. Dirk Schmidt-Arras  
geboren am 29. Mai 1977 in Forchheim

Gutachter:

- 1.
- 2.
- 3.

Tag des Rigorosums:

Tag der öffentlichen Verteidigung:

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>iii</b>
<b>1 Einleitung - Struktur, Funktion und Biosynthese von FLT-3</b>	<b>1</b>
1.1 FLT-3 in akuten myeloischen Leukämien . . . . .	1
1.2 Struktur und Funktion . . . . .	4
1.3 Proteinsynthese . . . . .	9
1.4 ER Qualitätskontrolle . . . . .	12
1.5 Transport zur Membran . . . . .	21
1.6 Kontrolle durch PTPasen . . . . .	22
1.7 Zielstellung der Arbeit . . . . .	26
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>27</b>
2.1 Materialien und Reagenzien . . . . .	27
2.2 Zelllinien . . . . .	28
2.3 Verwendete Puffer . . . . .	30
2.4 Mutagenese . . . . .	30
2.5 siRNA-Oligo Transfektion . . . . .	31
2.6 Aufreinigung von GST-CNX . . . . .	32
2.7 Pulldown mit GST-CNX . . . . .	33
2.8 Inhibitor-Behandlungen . . . . .	33
2.9 MTT Proliferationsassay . . . . .	35
2.10 in-vitro Kinasesassays . . . . .	35



<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1	FLT-3 ITD reift ineffizient. . . . .	37
3.2	Tyrosinphosphorylierung und ER Lokalisation von FLT-3 ITD . . . .	41
3.3	Tyrosinphosphorylierung als allgemeiner Regulator bei der Reifung von Rezeptortyrosinkinasen . . . . .	48
3.4	Spezifische Signalwege spielen eher eine untergeordnete Rolle bei der ER-Retention von FLT-3 ITD. . . . .	51
3.5	Strukturelle Parameter und HSP90-Abhängigkeit . . . . .	55
3.6	ER Qualitätskontrolle und ER Lokalisation von FLT-3 ITD . . . . .	60
3.7	ER-verankertes FLT-3 WT als Transformationsmodell für FLT-3 ITD? .	67
<b>4</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b>	<b>72</b>
4.1	Die Reifung von Rezeptortyrosinkinasen ist phosphotyrosinabhängig reguliert - FLT-3 ITD als Modell . . . . .	72
4.2	PTPasen als Regulatoren während der Biosynthese von Rezeptorty- rosinkinasen . . . . .	74
4.3	Strukturelle und molekulare Aspekte der ER-Retention von FLT-3 ITD . . . . .	76
4.4	Aberrante ER-Lokalisation als potentiell transformierendes Prinzip - Modelle und pharmakologische Konsequenzen . . . . .	81
<b>A</b>	<b>Danksagung</b>	<b>96</b>
<b>B</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>98</b>
<b>C</b>	<b>Erklärung zur Bewerbung</b>	<b>99</b>
<b>D</b>	<b>Curriculum vitae</b>	<b>100</b>
<b>E</b>	<b>Wissenschaftliche Arbeiten</b>	<b>101</b>

# Zusammenfassung

Die Rezeptortyrosinkinase FLT-3 ist in frühen myeloiden und B-lymphoiden Vorläuferzellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der normalen Differenzierung hämatopoetischer Zellen. Fehlerhafte Aktivität von FLT-3 ist mit akuter myeloischer Leukämie (AML) assoziiert. In etwa 30 % aller AML-Fälle treten Mutationen im *FLT-3*-Gen auf, die eine konstitutiv aktive Kinase zur Folge haben. Die am häufigsten auftretende Mutationen sind die sg. “internal tandem duplications” (ITD) in der Juxtamembrandomäne. FLT-3 mit ITD Mutation induziert ein anderes Muster an aktivierten Signalwegen als FLT-3 WT, was eine wichtige Rolle bei der Transformation spielt. Der Grund für das veränderte Signalverhalten war bisher unbekannt. In der vorliegenden Arbeit können wir zeigen, dass FLT-3 ITD nicht effizient reift und partiell im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten wird und dass diese Retention abhängig von seiner Kinaseaktivität ist. Hemmung der Kinaseaktivität durch Inhibitoren, Mutationen oder Coexpression von PTPasen resultierte in einer normalen Reifung des Rezeptors. Wir können ebenfalls zeigen, dass FLT-3 ITD im ER Qualitätskontrollsystem zurückgehalten wird und von molekularen Chaperonen wie Calnexin, HSP90 und ERp57 abhängig ist. Diese Abhängigkeit kann pharmakologisch ausgenutzt werden. Zudem können wir zeigen, dass ER Retention nicht nur bei onkogenem FLT-3 sondern allgemein bei hyperphosphorylierten Rezeptortyrosinkinasen auftritt und demnach Tyrosinphosphorylierung demnach ein allgemeiner gültiges Regulationsprinzip bei der Reifung von Rezeptortyrosinkinasen ist.

# Kapitel 1

## Einleitung - Struktur, Funktion und Biosynthese von FLT-3

*“Wer Großes leisten will, muß tief eindringen, scharf unterscheiden, vielseitig verbinden und standhaft beharren.”*

(aus: Friedrich Schiller, Über die Grenzen beim Gebrauch schöner Formen)

### 1.1 FLT-3 in akuten myeloischen Leukämien

#### Akute myeloische Leukämie

Akute myeloische Leukämie ist das Ergebnis somatischer Mutation(en) innerhalb einer hämatopoetischen Stammzelle oder einer etwas weiter differenzieren Vorläuferzelle der myeloiden Linie. Die so veränderten Vorläuferzellen, die man auch Blasten nennt, hyperproliferieren und reifen nicht mehr aus (s. Abb 1.1). Sie verdrängen im Knochenmark Vorläuferzellen anderer hämatopoetischer Linien, wodurch es zu Anämie und Thrombozytopenie kommt.

Auf der Suche nach Wachstumsfaktorrezeptoren, die in akuten Leukämien exprimiert sind, machten M.Nakao und Mitarbeiter eine interessante Entdeckung: in einigen der Patientenblasten konnten sie nachweisen, dass Sequenzbereiche in Exon 11 von *FLT3* dupliziert waren (Nakao et al. [1996]). Sie nannten diese Längenabnormalität *internal tandem duplication* oder kurz ITD. FLT-3 ist eine Rezeptortyrosinkinase und wurde in den neunziger Jahren aus fötalen hämatopoetischen Stammzellen isoliert (Übersicht in Schmidt-Arras et al. [2004]).

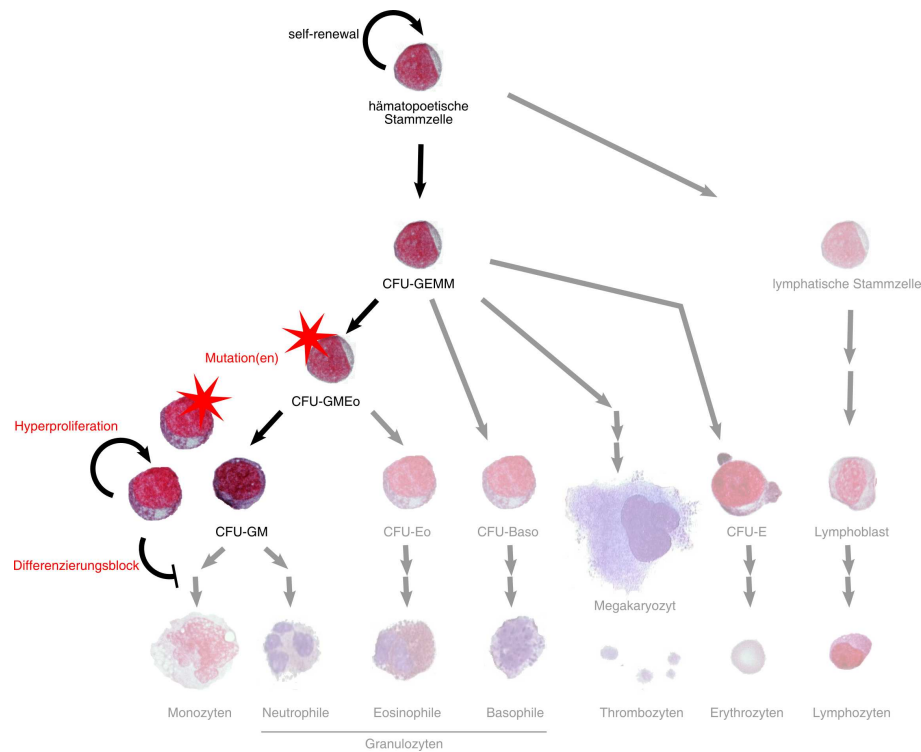


Abbildung 1.1: Vereinfachte Übersicht über Hämatopoese und Entstehung akuter myeloischer Leukämie (nach Hoffbrand et al. [2003]). Somatische Mutationen in myeloiden Vorläuferzellen führen zu ihrer Hyperproliferation und Ansammlung unreifer "Blasten". Diese können die normale Hämatopoese verdrängen. Hier dargestellt ist eine Entartung der monozytären Linie. Andere myeloide Linien können jedoch auch betroffen sein. Man unterscheidet daher verschiedene AML Subtypen.

### Die Familie der Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) sind eine Unterklasse der transmembranen Rezeptoren. Sie besitzen eine intrinsische enzymatische Aktivität, die sie in die Klasse der tyrosinspezifischen Phosphotransferasen, bzw. Proteintyrosinkinasen eingliedert. Die Kinaseaktivität ist reguliert und im Normalfall nur nach Ligandenbindung aktiv (s.Abb.1.2 B). Der jeweils spezifische Ligand bindet an die, bei verschiedenen RTKs, strukturell sehr unterschiedliche, Extrazellulärdomäne (s.Abb.1.2 A). Die aktivierte Kinasedomäne kann sich nun *in trans* autophosphorylieren (s.Abb.1.2 B) und nachfolgend Substratproteine, die ihrerseits weitere Signalkaskaden aktivieren können und so physiologische Antworten erzeugen. Die Kinasedomänen bestehen strukturell immer aus einem N- und einem C-terminalen Lappen. In manchen RTK-

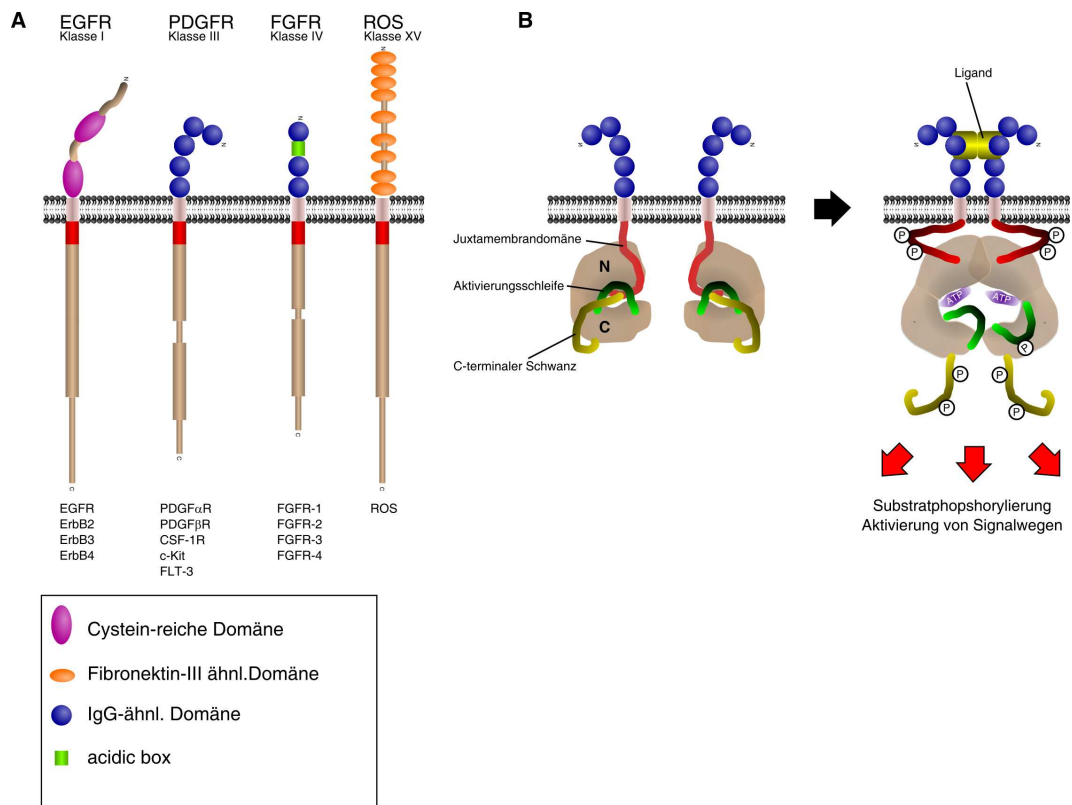


Abbildung 1.2: **Die Familie der Rezeptortyrosinkinasen (nach Blume-Jensen and Hunter [2001]).** **A:** Domänenstruktur einiger RTK-Familien. **B:** Ligandenabhängige Aktivierung von RTKs. Ligandenbindung, Dimer-Bildung und anschließende Konformationsänderungen und Phosphorylierung verschiedener Strukturelemente sind schematisch dargestellt. Dazu gehören Juxtamembran-Domäne (rot dargestellt), Aktivierungsschleife (grün) und der C-terminale Schwanz (gelb) der Proteintyrosinkinase.

Familien kann die Kinasedomäne sg. “kinase inserts” enthalten. Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen induziert sehr häufig Proliferation und anti-apoptotische Prozesse, manchmal die Migration der Zelle. Es ist daher nicht verwunderlich, dass aktivierende Mutationen innerhalb der RTK-Gene häufig in Tumoren zu finden sind.

### Klasse III Familie - FLT-3

FLT-3 ist ein Mitglied der Klasse III Rezeptortyrosinkinasenfamilie, zu der die Mitglieder PDGF Rezeptor  $\alpha$  und  $\beta$ , “stem cell factor” (SCF) Rezeptor c-Kit und der M-CSF Rezeptor gehören. Allen Mitgliedern gemeinsam ist die Ausbildung einer

sg. geteilten Kinasedomäne (KD), Juxtamembrandomäne (JM) und einer Extrazellulärdomäne (ECD), die sich in fünf Immunglobulin-ähnliche Domänen gliedert (s. Abb. 1.3 A). Die ECD wird an Asparagin-Resten (N-gebunden) glykosyliert, wobei in der FLT-3 ECD neun potentielle Glykosylierungsstellen gefunden werden können. FLT-3 tritt je nach Glykosylierungszustand als 130 kDa oder als 150 kDa Form auf. FLT-3 wird in Vorläuferzellen der myeloiden und B-lymphoiden Linie exprimiert, wobei seine Expression bei letzterer in ausdifferenzierten Zellen nicht mehr nachweisbar ist. Wichtig sind FLT-3 und sein Ligand FL ebenfalls für die Ausbildung von dendritischen Zellen. Der Ligand FL ist ein nicht kovalent verknüpftes Dimer, wobei jedes Monomer ein *four-helix-bundle* bildet. Bindung von FL an die ECD induziert Dimerisierung und Aktivierung von FLT-3, wobei es zur Transphosphorylierung der beiden Rezeptormonomere kommt, zur Phosphorylierung und Aktivierung rekrutierter Signalmoleküle und der Anschaltung von Signalwegen. Interessanterweise unterscheiden sich FLT-3 WT und FLT-3 ITD stark in der Qualität der angeschalteten Signalwege (Übersicht in Schmidt-Arras et al. [2004]).

## 1.2 Struktur und Funktion

### Struktur der Kinasedomäne

Zwei Jahre nach Entdeckung der FLT-3 ITD Mutation stellte sich heraus, dass diese zur konstitutiven Aktivierung der FLT-3 Kinase führt (Kiyoi et al. [1998]). Einige weitere Mutagenesestudien, u.a. auch mit c-Kit (s.u.) ergaben, dass die Juxtamembrandomäne der Klasse III Rezeptortyrosinkinasen generell eine wichtige Rolle bei der Regulation der Kinaseaktivität spielt und dass strukturelle Störungen jeder Art, seien es Insertionen oder Deletionen, egal welcher Länge, die autoinhibitorische Funktion der Juxtamembrandomäne (JMD) zerstören. Es wurde lange über den molekularen und strukturellen Mechanismus spekuliert. Doch erst die Aufklärung der Kristallstruktur der Kinasedomänen von EphB2 und schließlich von FLT-3 selber, sowie des homologen c-Kit konnten den inhibitorischen Mechanismus klären. Die Kristallstruktur von FLT-3 zeigt ein Protein, in einen N-

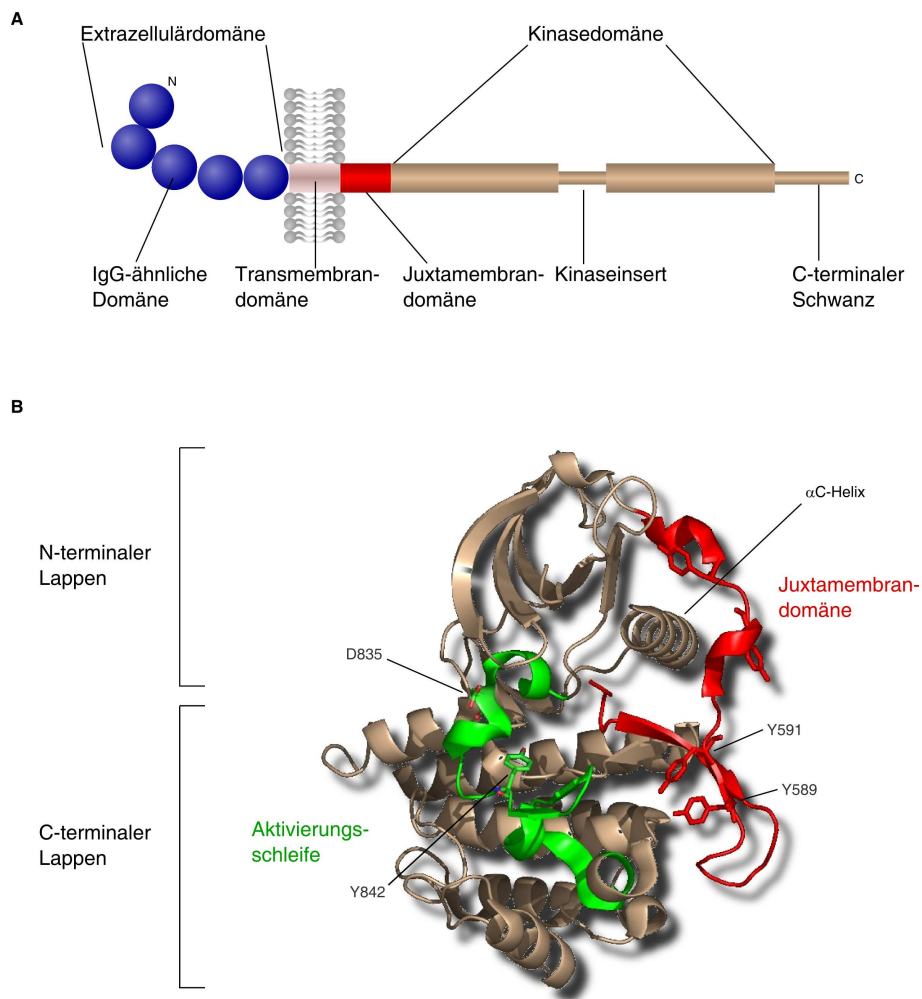


Abbildung 1.3: **A:** Domänenstruktur von Klasse-III Rezeptortyrosinkinasen wie FLT-3. **B:** Kristallstruktur von FLT-3 (PDB entry: 1RJB)

terminalen und einen C-terminalen Kinaselappen, die Aktivierungsschleife und die Juxtamembrandomäne untergliedert ist (Griffith et al. [2004]). Der N-terminale Lappen besteht hauptsächlich aus einem fünfsträngigem  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta 1$ - $\beta 5$ ) und einer  $\alpha$ -Helix ( $\alpha C$ ). Der C-terminale Lappen ist hauptsächlich  $\alpha$ -helikal, mit sieben Helices ( $\alpha D$ ,  $\alpha E$ ,  $\alpha EF$ ,  $\alpha F$ - $\alpha I$ ) und drei  $\beta$ -Strängen ( $\beta 6$ - $\beta 8$ ). Das für die Klasse III Rezeptortyrosinkinasen typische Kinaseinsert, das eine ausgedehnte Schleifenregion zwischen den Helices  $\alpha D$  und  $\alpha E$  bildet, wurde nicht mitkristallisiert (s. Abb. 1.3). Die Aktivierungsschleife wird durch die konservierten Aminosäuretripleette

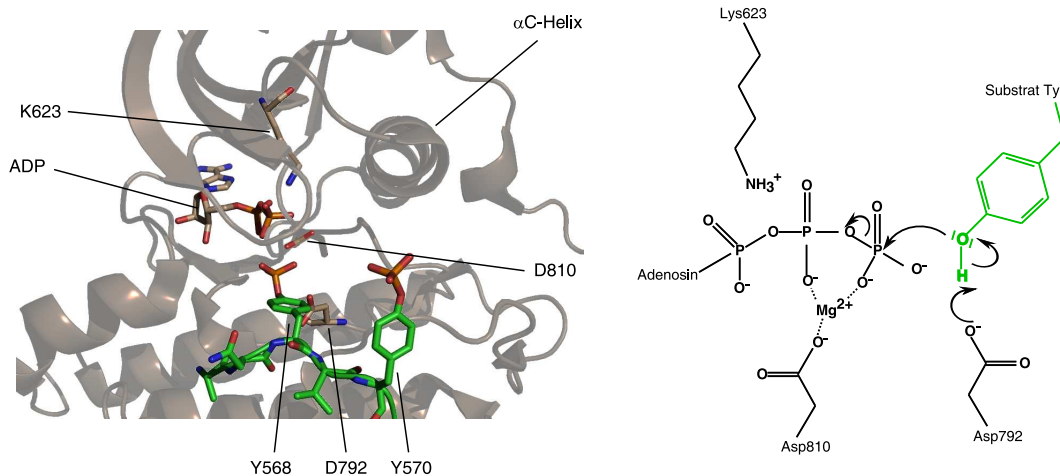


Abbildung 1.4: **Katalytischer Mechanismus der Substratphosphorylierung.** links: Räumliche Orientierung der wichtigsten katalytischen Reste im c-Kit Kristall. Substrat ist hier das Juxtamembrantyrrosin Tyr568 eines zweiten c-Kit Moleküls. rechts: Katalysemechanismus.

Asp829-Phe830-Gly831 (DFG) und Ala856-Pro857-Glu858 (APE) begrenzt. Asp829 ist in Kinasen konserviert und komplexiert das ATP-gebundene Magnesium, das wichtig für die Positionierung der Phosphate während des Phosphotransfers ist (s. Abb. 1.4). Das einzige Tyrosin der Aktivierungsschleife, Tyr842, ragt mit seinem phenolischen Ring in das katalytische Zentrum und bildet eine Wasserstoffbrücke mit Asp811, das wiederum ein Ionenpaar mit Arg834 bildet. Zwei Studien konnten vor kurzem zeigen, dass neben Tyr842, auch die Reste Tyr589, Tyr591, Tyr599, Tyr726, Tyr955 und Tyr969 Autophosphorylierungsorte sind (Heiss et al. [2006], Rocnik et al. [2006]).

### Die Juxtamembrandomäne

Die Reste Tyr572 bis Met578 liegen tief in die FLT-3 Struktur eingebettet, wobei Tyr572 in eine Tasche zeigt und u.a. ionische Kontakte mit dem konservierten Glu661 und dem für den Phosphotransfer wichtigen Lys644 eingeht (s. Abb. 1.5). Die Reste Gln575 bis Met578 formen mit  $\beta 6$  ein  $\beta$ -Faltblatt, was die Ausbildung des  $\beta 9\beta 6$ -Faltblattes mit der Aktivierungsschleife im aktiven Zustand (siehe unten), verhindert. Tyr589 und Tyr591 von FLT-3 liegen im Kristall in einer autoinhibier-



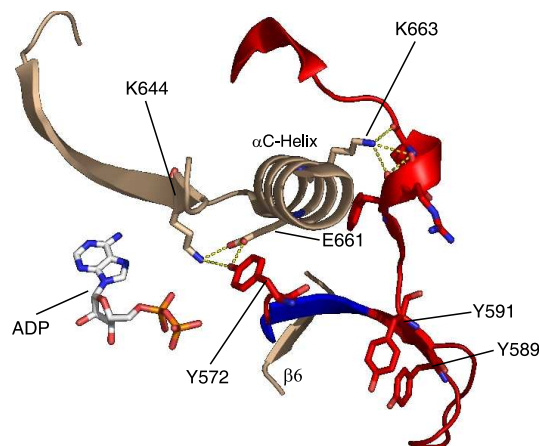


Abbildung 1.5: **Interaktion der FLT-3 Juxtamembrandomäne (rot) mit dem N-terminalen Kinaselappen (beige).** Dargestellt in gelb sind die ionischen Wechselwirkung von Tyr572 mit dem katalytischen Lys644 und Glu661 der  $\alpha$ C-Helix, sowie die Interaktion von Lys663 mit der Juxtamembrandomäne. Der Abschnitt der Juxtamembrandomäne, der mit  $\beta$ 6 ein  $\beta$ -Faltblatt formt, ist in blau dargestellt.

ten, inaktiven Konformation vor. Vor kurzem wurde eine aktivierende Lys663Gln Mutation entdeckt (Schittenhelm et al. [2006]). Lys663 in der  $\alpha$ C-Helix bildet im Kristall ionische Wechselwirkungen mit dem Proteinrückgrat der Juxtamembrandomäne, die die inhibierte Konformation der Juxtamembrandomäne stabilisiert.

### Potentieller Aktivierungsmechanismus

Von der homologen Rezeptortyrosinkinase c-Kit konnten Kristallstrukturen sowohl von der aktiven als auch von der inaktiven Form gewonnen werden (Dibb et al. [2004]). Daraus ergaben sich Hinweise auf den Aktivierungsmechanismus von Klasse III-Rezeptortyrosinkinasen. Die Konformationsänderungen bei der Aktivierung einer Proteinkinase ermöglichen den Zugang des Substrats zum katalytischen Spalt und positionieren die für den Phosphotransfer wichtigen Aminosäurereste. Bei der Aktivierung von c-Kit rotiert die Aktivierungsschleife um Asp810 des DFG-Motivs. Der angrenzende Aminosäureabschnitt Leu-Ala-Arg-Asp-Ile, der im inaktiven Zustand eine  $\alpha$ -Helix formt, paart sich nun mit  $\beta$ 6 zum  $\beta$ -Faltblatt  $\beta$ 9 $\beta$ 6 (siehe Abb.1.6), das die aktive Konformation des Aktivierungsloops stabilisiert. Aktivierende Muta-

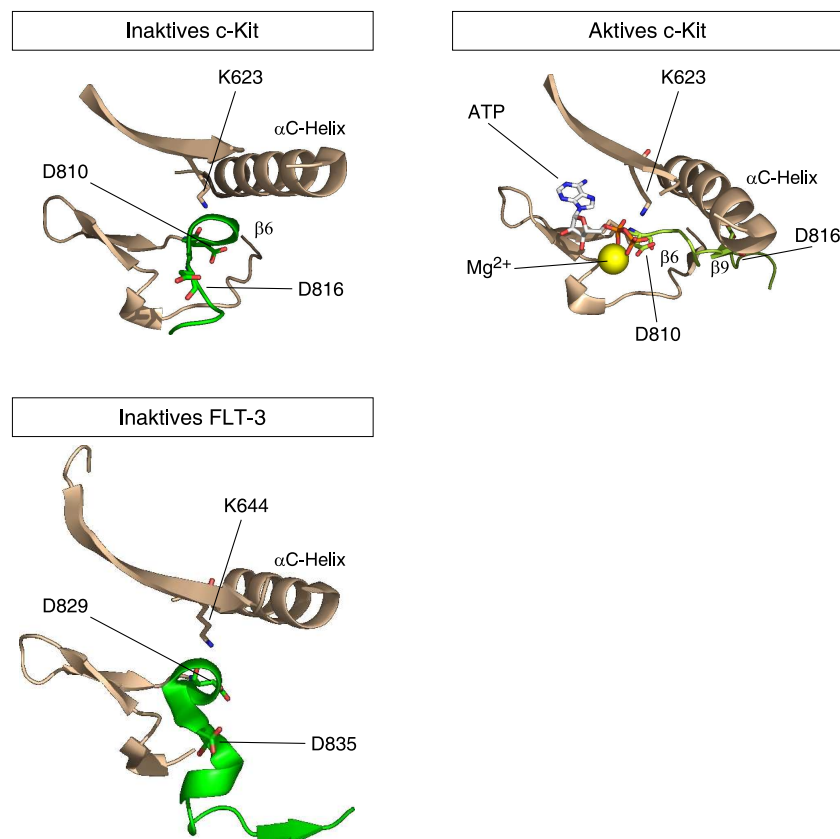


Abbildung 1.6: **Konformationsänderung des Aktivierungsloops bei c-Kit.** Der Aktivierungsloop (beginnend mit dem DFG Motiv) ist in *grün* für die inaktive (PDB entry: 1T46) und in *gelb* für die aktive (PDB entry: 1PKG) Konformation dargestellt. Erkennbar ist die "Scharnierfunktion" des DFG-Motivs bei der Konformationsänderung des Aktivierungsloops und die Bildung des  $\beta 6/\beta 9$ -Faltblattes in der aktiven Konformation. Erkennbar ist auch die Positionierung von Asp835 am Ende der  $\alpha$ -Helix der Reste 836-842 bei FLT-3.

tionen in diesem Bereich betreffen meist Asp816 bei c-Kit, bzw. Asp835 bei FLT-3. Eine Erklärung für die Aktivierung durch diese Mutationen wäre, dass das negativ geladene Asp816 im inaktiven Zustand das positive Dipolmoment einer kleinen, angrenzenden  $\alpha$ -Helix (Ile817 bis Asn820 bzw. Ile836 bis Asn842 bei FLT-3) stabilisiert (siehe Abb.1.6). Hinzu kommt, dass Asp816 in der aktiven Konformation die gleiche Position wie Val559 aus der Juxtamembrandomäne annimmt. Val559 und Val560 stabilisieren im inaktiven Zustand eine hydrophobe Region, die durch die Reste Val643 und Tyr646 der  $\alpha$ C-Helix, Asn787 und Cys788 der  $\beta 6$ -Region und Tyr570 und Ile571 der Juxtamembrandomäne gebildet wird. Die bei c-Kit am

häufigsten auftretenden onkogenen Mutationen sind dabei Asp816 zu Valin und Val559 bzw. Val560 zu Aspartat. Ein hydrophober Rest an Position 816 begünstigt die Interaktion mit der hydrophoben Region der  $\alpha$ C-Helix, was die aktive Konformation stabilisiert, während ein hydrophiler Rest an Position 559 bzw. 560 die Interaktion mit dieser Region und damit die autoinhibierte Konformation erschwert.

Bevor sich jedoch bei der Aktivierung das  $\beta$ 9 $\beta$ 6-Faltblatt bilden kann, muss sich die Juxtamembrandomäne aus ihrer inhibitorischen Position entfernen. Dazu werden die Reste Tyr568 und Tyr570 (bzw. Tyr589 und Tyr591 bei FLT-3) vermutlich autophosphoryliert, bzw. möglicherweise heterolog durch Kinasen der Src-Familie *in trans* phosphoryliert (Heiss et al. [2006]). Die große und geladene Phosphatgruppe erschwert dann die korrekte Positionierung dieser Reste und die Interaktion mit dem C-terminalen Lappen, die Juxtamembrandomäne faltet aus der Kinasedomäne heraus und gibt diese für weitere Konformationsänderungen frei.

Die Rolle des C-Terminus von FLT-3 mit den Autophosphorylierungsorte Tyr955 und Tyr969 ist unklar. Untersuchungen am PDGF $\beta$  Rezeptor zeigten, dass der C-Terminus eine autoinhibitorische Rolle spielt. Auch beim CSF-1 Rezeptor übernimmt der C-Terminus eine negativ regulatorische Funktion (Chiara et al. [2004]). Im Onkogen *v-fms* ist der C-Terminus deletiert und eine Tyr969Phe Mutation erhöht das transformierende Potential des CSF-1 Rezeptors (Hesketh [1995]).

### 1.3 Proteinsynthese

Die ersten Aminosäuren der entstehenden Polypeptidkette einer Rezeptortyrosinkinase, wie auch anderer Transmembranprotein, enthalten die sg. Signalsequenz. Sobald diese den Ausgangstunnel des Ribosoms verlassen hat, wird sie von der GTPase SRP (signal recognition particle) gebunden und über den SRP Rezeptor (SR) an den Translokonskomplex im endoplasmatischen Retikulum (ER) rekrutiert. Der Translokonskomplex besteht hauptsächlich aus einem Kanal, der ein Durchschleusen von Proteinen durch die Lipidmembran ermöglicht und aus dem heterotrimeren Sec61 Protein gebildet wird. Sec61 erkennt Transmembranhelices, die

überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren bestehen, über eine noch nicht näher bekannte direkte Wechselwirkung zwischen der Transmembranhelix und der Lipiddoppelschicht. Sobald eine Transmembranhelix erkannt wurde, entläßt der Sec61-Komplex die Polypeptidkette aus dem Kanal in die Lipidmembran, das Ribosom dissoziiert vom Translokongkomplex und synthetisiert den Rest des Proteins in das Zytoplasma (Hessa et al. [2005]). Bereits die ersten Aminosäuren der neu in das ER synthetisierte Polypeptidkette werden von einem "Willkommenskomitee" aus Signalpeptidase, den Chaperonen BiP, Calnexin oder Calreticulin, der Oligosaccharyltransferase und möglicherweise anderen Faktoren, in Empfang genommen, sobald sie den Translokongkomplex verlassen (Helenius and Aeby [2004]). Die Signalsequenz wird von der Signalpeptidase abgespalten. Die Oligosaccharyltransferase (OST) scanned die Polypeptidkette nach Glykosylierungsstellen (mit dem Konsensusmotiv Asn-X-Ser/Thr bei der N-gekoppelten Glykosylierung) und transferiert eine Hochmannose-Glykanstruktur auf die Seitenkette des Akzeptorasparagins, sobald dieses 12-14 Aminosäuren ins ER Lumen ragt (s.Abb. 1.7). Eine cotranslationelle Glykosylierung ist wichtig, da Glykane die Faltung von Glykoproteinen beeinflussen. Im Falle der Rezeptortyrosinkinasen gibt es zwei (unabhängige ?) Faltungsprozesse: die Faltung der Extrazellulärdomäne im ER Lumen und die Faltung der Kinasedomäne auf der zytoplasmatischen Seite des ERs. Die Proteinfaltung geschieht cotranslationell und wird von Chaperonen unterstützt. Die Faltung von naszenten Polypeptidketten wird durch Chaperone der HSP70 Familie assistiert (Hsc70 im Zytoplasma, BiP im ER) (Molinari and Helenius [2000]). Die "Feinfaltung" schon nahezu nativer Strukturen übernehmen die Chaperone der HSP90-Familie (HSP90 im Zytoplasma, Grp94 im ER). Initiale Disulfidbrücken werden im ER durch Proteindisulfidisomerasen (PDI) geknüpft, während ERp57 das "Shuffling" und endgültige Setzen von Disulfidbrücken übernimmt.

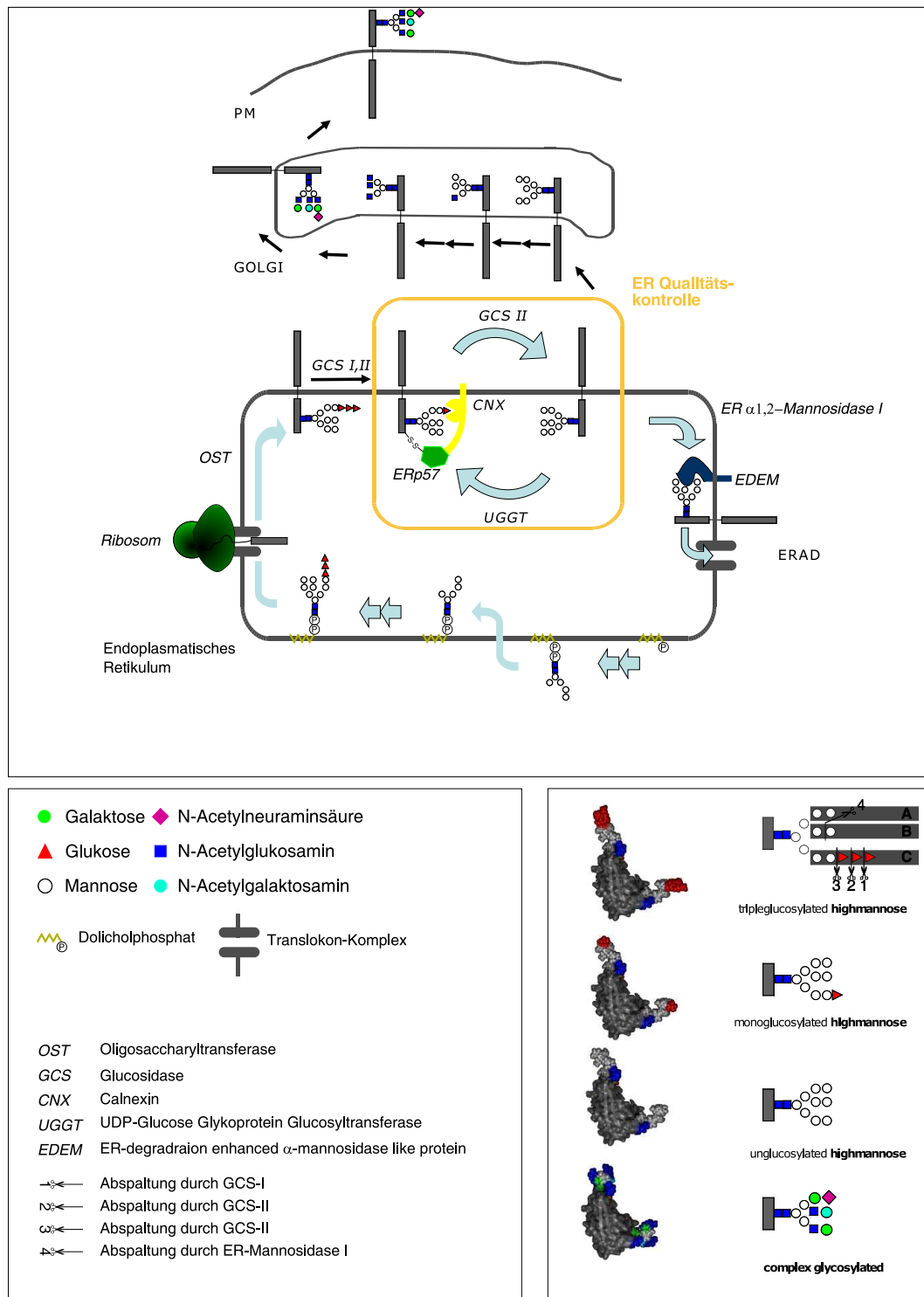


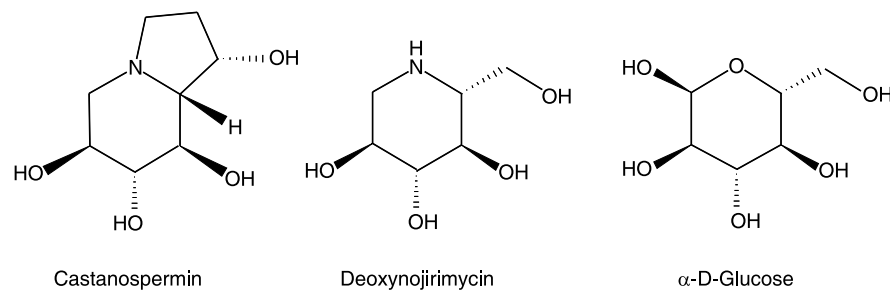
Abbildung 1.7: **Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum.** *oben:* vereinfachte Darstellung des N-gekoppelten Glykosylierungsprozesses und der ER Qualitätskontrolle. *unten, links:* Abkürzungen und Legende. *unten, rechts:* mit SWEET-II modellierte Struktur einer glykosylierten IgG-Domäne des VEGF Rezeptors I; rechts daneben, schematische Glykandarstellung.

## 1.4 ER Qualitätskontrolle

Die Faltung ER-luminaler Proteine, aber auch die Faltung der Extrazellulärdomäne von Transmembranproteinen wird innerhalb des endoplasmatischen Retikulums einer Qualitätskontrolle unterzogen. Die Enzyme Glukosidase I und Glukosidase II katalysieren in einem sequenziellen Prozess die Abspaltung der zwei terminalen Glukosereste. Die entstehenden monoglukosylierten Proteine können nun von den Chaperonen Calnexin und Calreticulin gebunden werden. Diese Bindung wird wieder gelöst, sobald der letzte Glukoserest durch Glukosidase II abgespalten wird. Das Glykoprotein wird nun einer Faltungskontrolle durch das Enzym UDP-Glukose Glykoprotein Glykosyltransferase (UGGT) unterzogen. Bei nicht vollständiger oder Fehlfaltung wird das Protein durch UGGT glukosyliert. Das nun monoglukosylierte Protein bindet wieder an Calnexin oder Calreticulin und bekommt die Möglichkeit sich vollständig zu falten. Dieser Kreislauf wiederholt sich so lange, bis das Protein richtig gefaltet ist, an das Lektin ERGIC-53 bindet und in den GOLGI-Apparat transportiert wird. Sollte sich das Protein in einer gewissen Zeit nicht richtig falten, so wird es der ER-assoziierten Degradation (ERAD) zugeführt. Die “Stoppuhr” ist dabei gewissermaßen die langsam katalysierende ER-Mannosidase I, die einen terminalen Mannose-Rest aus dem B-Zweig entfernt und dadurch Glykoproteine aus dem Qualitätskontrollzyklus entfernt. EDEM (ER degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein) ist ein Mannosidase-ähnliches Protein ohne katalytische Aktivität und nimmt die durch die ER-Mannosidase I “gestutzten” Proteine in Empfang, in dem es mit Calnexin/Calreticulin um die Bindung kompetiert. Die so entfernten Proteine werden dem Sec61 Translokion zugeführt, aus dem ER ausgeschleust und anschließend dem Ubiquitin-Proteasom-System übergeben und degradiert (Helenius and Aebi [2004], Oda et al. [2003]).

### Der Faltungssensor UGGT und die Glukosidasen I und II

Der Faltungssensor UDP-Glukose Glykoprotein Glykosyltransferase ist ein großes, ER-luminales Protein. UGGT erkennt nicht nur denaturierte Proteine, sondern auch

Abbildung 1.8: **Glukosidaseinhibitoren.** Rechts dazu im Vergleich Glukose.

geringe Abweichungen von der nativen Tertiärstruktur, aber auch Abweichungen in der Quartärstruktur (Caramelo et al. [2004], Keith et al. [2005]). Sobald ein Defekt erkannt wurde, transferiert UGGT einen Glukoserest auf die  $\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$  Glykanstruktur des Glykoproteins. Nach wie vor kontrovers wird diskutiert, ob UGGT Faltungsdefizienzen nur bei Glykoproteinen, oder auch bei nicht-glykosylierten Proteinen erkennen kann. Abweichungen von der nativen Struktur werden vermutlich anhand von hydrophoben Regionen im Substratpeptid erkannt, wie Experimente mit kurzen Peptiden zeigten (Taylor et al. [2003]). Die Abweichungen können lokal beschränkt sein, wobei die Glukosylierung vermutlich in der Nähe der Faltungsdefizienz erfolgt (Ritter et al. [2005]). Interessanterweise ist die Effizienz der Re-Glukosylierung abhängig von der Glykanstruktur. Eine verminderte Anzahl an Mannoseresten in den Zweigen **B** und **C** des Glykans (s. Abb.1.7 unten re.) reduziert die Effizienz der Glukosylierung drastisch, was vermutlich wichtig für das Zusammenspiel von Calnexin-Zyklus und ER-abhängiger Degradation ist (Helenius and Aebi [2004]).

Glukosidase I ist ein Typ-II Transmembran-Glykoprotein von 82 kDa, mit einem kurzen zytosolischen Schwanz, einer Transmembrandomäne und einer großen lumenalen Ektodomäne, die die Glukosidase-Aktivität trägt. Zusammen mit Glukosidase II verhindert es die Assoziation der Protein-gebundenen Glykane an die Oligosaccharyltransferase und ermöglicht damit den Glykoproteinen den Eintritt in die ER Qualitätskontrolle. Sowohl Glukosidase I, als auch Glukosidase II sind durch polyhydroxylierte Indolizidon Alkaloide wie Castanpospermin, aber auch



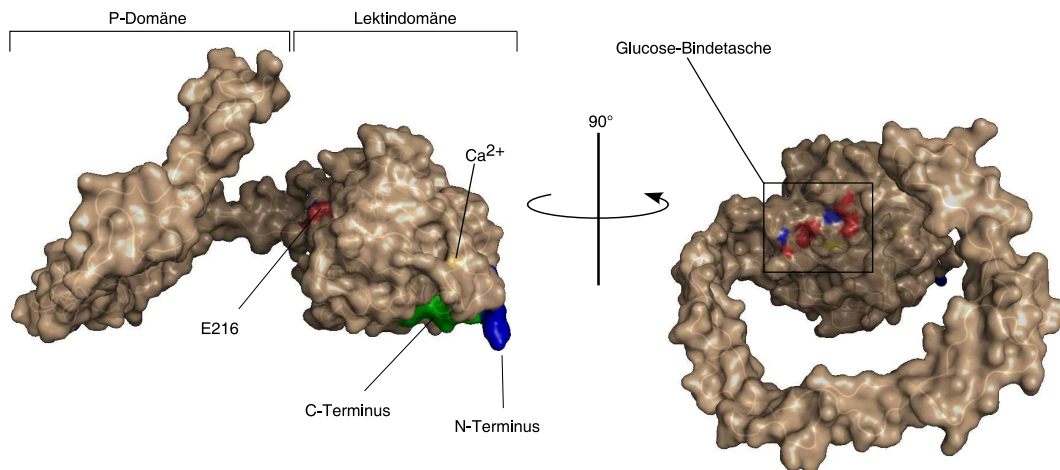


Abbildung 1.9: **Kristallstruktur der luminalen Domäne von Calnexin.** Transmembran- und zytoplasmatische Domäne schließen sich am C-Terminus an. (PDB entry: 1JHN)

durch Aza-Zucker wie Deoxynojirimycin hemmbar (Helenius and Aebi [2004]).

Glukosidase II ist ein lösliches, lumenales Heterodimer, das aus den zwei Peptidketten  $\alpha$  mit 107 kDa und  $\beta$  mit 54 kDa besteht. Die  $\alpha$ -Kette besitzt eine C-terminale Hydrolase-Aktivität. Die  $\beta$ -Kette ist ein stark konserviertes Glykoprotein und enthält eine Mannose-bindende MRH Domäne, die bei der Regulation der Glukosidase II durch Hochmannose-Glykanstrukturen *in trans* und *in cis* eine Rolle spielt.

### Calnexin, Calreticulin

Die Calnexin-Familie umfaßt die Transmembranproteine Calnexin und Calmegin, sowie das lumenale Protein Calreticulin. Während Calnexin und Calreticulin ubiquitär vorhanden sind, beschränkt sich die Expression von Calmegin auf den Hoden. Strukturell gliedert sich Calnexin in die globuläre Lektindomäne, die längliche P-Domäne, eine Transmembrandomäne und einen kurzen cytoplasmatischen Schwanz (Schrage et al. [2001]). Die Lektindomäne wird aus einem konkaven, sechssträngigen und einem konvexen, siebensträngigen  $\beta$ -Faltblatt geformt und ist strukturell verwandt mit Pflanzenlektinen. In-vitro Versuche konnten zeigen, dass Calnexin und Calreticulin ausschließlich monoglukosylierte Hochmannosestrukturen binden.



Der Glukoserest bindet dabei hauptsächlich mit seinen Hydroxylresten über Wasserstoffbrücken in eine Bindetasche, in der vor allem saure Reste an den Positionen 216 und 425 stark konserviert sind. In Calnexin und Calmegin sind dies Glutamat, in Calreticulin Aspartat. Mutiert man einen dieser Reste zu Alanin, so wird die Lektinfunktion zerstört. Die P-Domäne besteht aus jeweils vier Kopien von zwei verschiedenen, Prolin-reichen Sequenzmotiven, die sich im Arm der P-Domäne reziprok aneinanderlagern und kurze  $\beta$ -Faltblätter bilden. Die P-Domäne vermittelt Protein-Protein Wechselwirkungen mit anderen Co-Chaperonen wie z.B. ERp57. Der cytoplasmatische Schwanz von Calnexin kann von Erk-1 an Ser563 und von Casein kinase II (CK-2) an Ser534 und Ser544 phosphoryliert werden, wobei die Phosphorylierung die Interaktion von Calnexin mit Translokon assoziierten Ribosomen erhöht (Wong et al. [1998], Chevet et al. [1999]). Calnexin und Calreticulin weisen vor allem im Bereich der Lektindomäne eine hohe Sequenzidentität auf, was den Schluss nahe legt, dass beide strukturell und funktionell sehr ähnlich sind. Beide Proteine besitzen Chaperonfunktion und sind an der Retention von mißgefalteten Proteinen im ER beteiligt. Die bei zystischer Fibrose auftretende  $\Delta F508$  Mutation des Chloridionenkanals CFTR führt zu seiner Fehlfaltung und Retention im ER, an der auch Calnexin und Calreticulin beteiligt sind (Harada et al. [2006], Wang et al. [2006]). Auch der Antigen präsentierende MHC Klasse I Komplex wird durch Calnexin im ER zurückgehalten, falls dieser nicht Peptid-beladen ist (Jackson et al. [1994]). Hemmt man die Bildung der monoglukosylierten Hochmannoseform durch den Einsatz von Glukosidasehemmern wie Castanospermin und Deoxynojirimycin, so werden diese Glykoproteine nicht mehr im ER zurückgehalten. Die Retention wird demnach hauptsächlich durch die Lektindomäne von Calnexin vermittelt (Molinari et al. [2004]). Vor kurzem konnte allerdings gezeigt werden, dass Calnexin auch an nicht glykosylierte Proteine binden kann und dass diese Assoziation über die Transmembrandomäne von Calnexin vermittelt wurde (Swanton et al. [2003]).

Obwohl die Lektinfunktion von Calnexin und Calreticulin identisch ist, assoziieren beide mit unterschiedlichen, aber zum Teil identischen Glykoproteinen. Diese

Diskrepanz der sg. “Klientenproteine” ist auf die unterschiedliche Lokalisation innerhalb des endoplasmatischen Retikulum zurückzuführen. Deletiert man nämlich bei Calnexin den C-Terminus einschließlich der Transmembrandomäne, sodass ein lumenal lösliches Calnexin entsteht, assoziiert diese Mutante mit typischen Calreticulinpartnern. Verankert man hingegen Calreticulin in der Membran - so binden daran Glykoproteine, die normalerweise mit Calnexin assoziieren (Danilczyk et al. [2000]). Calnexin interagiert daher präferentiell mit Transmembran- und Calreticulin mit lumenalen Glykoproteinen.

### **ERp57**

ERp57 ist eine ER-ständige Disulfid-Oxidoreduktase der Familie der Proteindisulfidisomerasen (PDI). Disulfid-Oxidoreduktasen katalysieren die Oxidation von Cysteinen zur Ausbildung von Disulfidbrücken während der Proteinfaltung. Dabei kann man zwei verschiedene Phasen unterscheiden: die co-translationelle und die post-translationelle. In der co-translationellen Phase, die wenige Minuten dauert, werden intramolekulare Disulfidbrücken gebildet, die eine initiale Faltung des Proteins ermöglichen. In der post-translationellen Phase werden Disulfidbrücken rearrangiert, bis die korrekte Faltung erreicht ist und das Protein die Qualitätskontrolle passieren kann. Man spricht bei der zweiten Phase auch vom “Disulfidbrücken-Shuffling” (Ellgaard and Ruddock [2005]). ERp57 ist, wie die meisten Mitglieder der PDI Familie in vier Domänen eingeteilt: **a**, **b**, **b'**, **a'**. Alle vier Domänen haben eine Thioredoxin-ähnliche Faltung (s. Abb. 1.10 B). Die Domänen **a** und **a'** besitzen das charakteristische CXXC Motiv und sind katalytisch aktiv, während die anderen zwei Domänen katalytisch inaktiv sind.

Die **b'** Domäne von ERp57 bindet über ionische Wechselwirkungen an die Spitze des P-Arms von Calnexin. Während andere Proteindisulfidisomerasen auch native Polypeptidketten binden können, beschränkt sich das Substratspektrum von ERp57 auf Glykoproteine. Die Assoziation mit Calnexin oder Calreticulin dient daher der Substratrekrutierung, aber auch der Aktivierung. Die Oxidoreduktase-Aktivität wird durch die Interaktion mit Calnexin oder Calreticulin dramatisch erhöht.

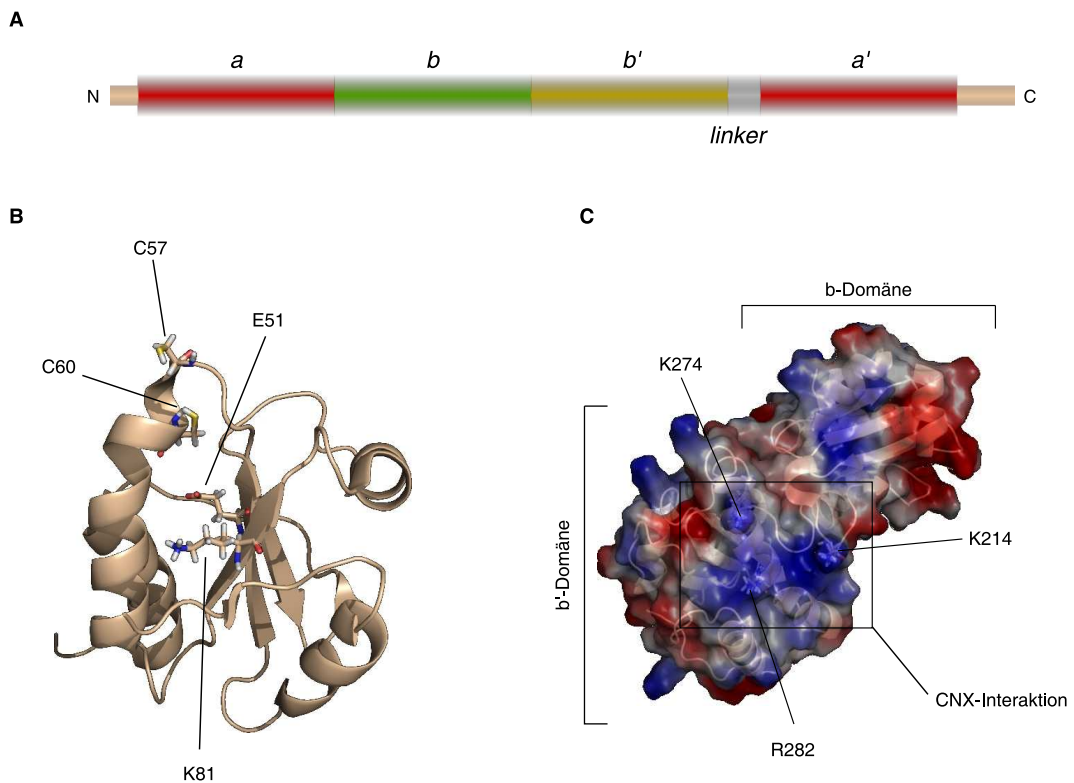


Abbildung 1.10: **A: Domänenstruktur von ERp57. B: NMR-Struktur der a-Domäne von ERp57** (PDB entry: 2ALB) mit Cys57 und Cys60 des CXXC Motivs. Glu51 und Lys81 dienen als Protonenpuffer während der Katalyse **C: Kristallstruktur der bb'-Domäne von ERp57.** (PDB entry: 2H8L) Dargestellt ist die Proteinoberfläche. In *blau* positives und in *rot* negatives Oberflächenpotential.

(Silvennoinen et al. [2004]). Während der Katalyse bildet sich eine transiente Disulfidbrücke zwischen dem N-terminalen Cystein des CXXC Motivs und dem Substratpeptid aus. Die katalytischen Cysteine in ERp57 liegen außerhalb der Katalyse in der reduzierten Form vor. So kann das N-terminale Cystein beim Disulfidbrücken-Shuffling über einen nukleophilen Angriff vorhandene Disulfidbrücken im Substratpeptid öffnen. Die kovalente Interaktion mit dem Substratpeptid ermöglicht nicht nur die Ausbildung korrekter Disulfidbrücken, sondern hält das unfertig gefaltene Protein im ER zurück und verhindert seine proteasomale Degradation (Ellgaard and Ruddock [2005], Kozlov et al. [2006]). Proteindisulfidisomerasen lassen sich pharmakologisch mit N-Ethylmaleinimid oder Bacitracin hemmen. Während N-Ethylmaleinimid allgemein Sulhydrylgruppen modifiziert, ist der Wirk-

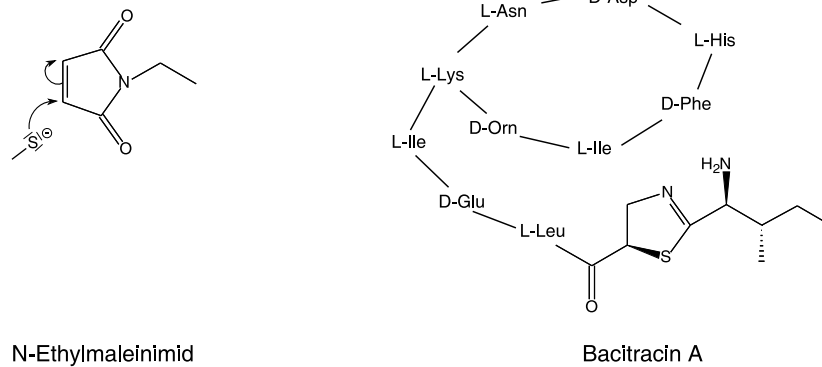


Abbildung 1.11: **Inhibitoren für Proteindisulfidisomerasen.** *linke Seite:* Gezeigt ist der nukleophile Angriff der Thiolatgruppe eines Cysteins an NEM. *rechte Seite:* Strukturformel von Bacitracin A. Bacitracin A macht 70 % der handelsüblichen Bacitracin-Mischungen aus.

mechanismus von Bacitracin nicht bekannt (s. Abb. 1.11).

Deletion von Calreticulin, ERp57 oder UGGT führen in Mäusen zu Embryoletalität. Deletion von Calnexin ist zwar nicht embryoletal, führt allerdings zu massiven Pathologien, die zu einem frühzeitigen Tod führen. Für die Organentwicklung und -integrität scheint das Calnexin-Chaperonsystem also unabdingbar zu sein. Auf zellulärer Ebene hingegen werden Deletionen innerhalb dieses System gut toleriert. Glykoproteine werden trotzdem richtig gefaltet und an die Zelloberfläche transportiert. Lediglich die Faltung einiger weniger Glykoproteine, wie z.B. des MHC I Peptidladekomplexes, ist strikt vom Funktionieren des Calnexin-Chaperonsystems abhängig. Diese Tatsache deutet daraufhin, dass es noch weitere Faltungs- und Qualitätskontrollsysteme geben muss (Solda et al. [2006]).

### HSP90/Cdc37

Die hoch konservierte HSP90 Familie beinhaltet die zytosolischen Proteine HSP90 $\alpha$  und  $\beta$  im Menschen, Hsp86 und Hsp84 in der Maus, Hsp83 in *Drosophila* und Hsc82 und Hsp82 in der Hefe. Bei Eukaryoten kennt man zudem noch Grp94, ein ER lumenales Protein. Im Gegensatz zu HSP70 Proteinen, beteiligt sich zytosolisches HSP90 nicht an der Faltung naszenter Proteine, sondern bindet an nahezu native Konformationen. Die meisten HSP90-regulierten Proteine, derer man

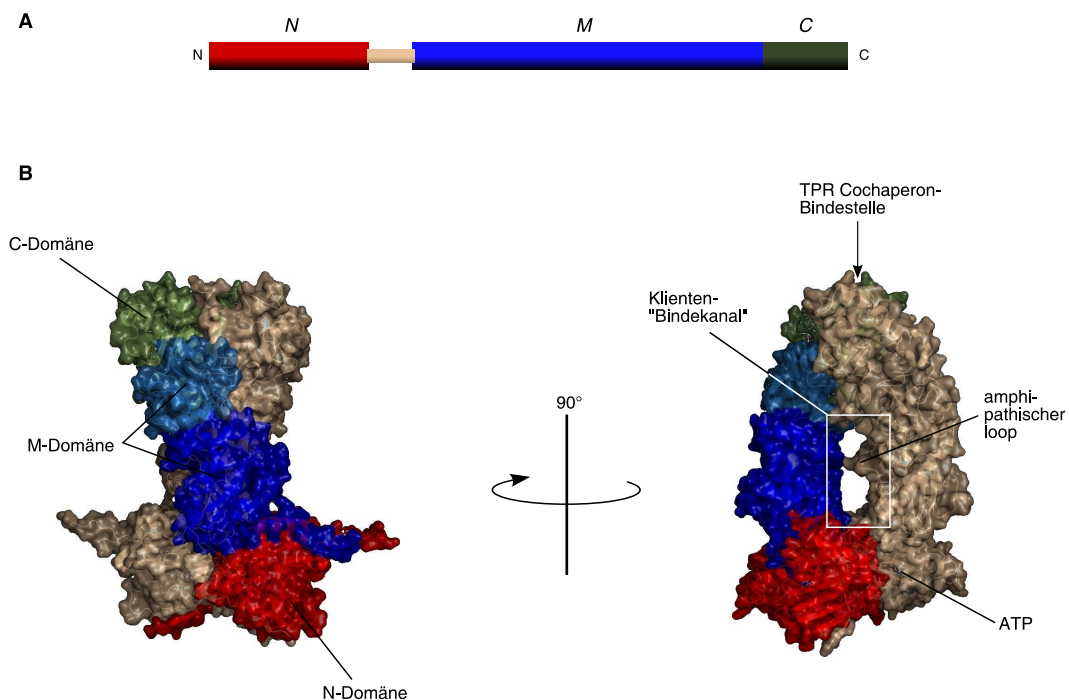


Abbildung 1.12: **A:** Domänenstruktur von HSP90. **B:** Kristallstruktur eines HSP90-Dimers (PDB entry: 2CG9) im geschlossenen Zustand. Der amphipathische loop der M-Domäne ist vermutlich an der Substratbindung beteiligt.

bereits mehr als 100 kennt, sind an Signaltransduktionsprozessen beteiligt, wobei HSP90 die Signalmoleküle in einem funktionstüchtigen Zustand erhält (Young et al. [2001]).

Hsp90 besteht aus drei Domänen und liegt in der Zelle als konstitutives Homodimer vor, wobei die Monomerinteraktion durch die C-terminale Domäne vermittelt wird. In der N-terminalen Domäne liegt die ATP-Bindestelle, die auch eine niedrig-affine Bindestelle für inhibierende Ansamycin-Antibiotika, wie Geldanamycin (GA, s. Abb. 1.13), ist. HSP90 lässt sich vermutlich als eine “molekulare Klemme” vorstellen (s. Abb. 1.12). Im Nukleotid-freien Zustand liegt es in einer offenen Konformation vor und kann so Substrate binden. ATP-Bindung führt zu einer Konformationsänderung und schließt die “Klemme”, wobei ein Klemmendurchmesser von 3-4 nm entsteht. Dieser freie Raum ist sicher nicht ausreichend, um ganze Proteine zu binden, wohl aber für einzelne Domänen. Es ist jedoch auch

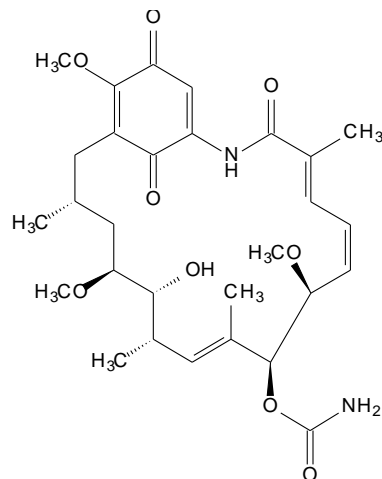


Abbildung 1.13: Geldanamycin, ein HSP90-Hemmstoff, der in die ATP-Tasche bindet.

möglich, dass durch die Schließung der Klemme, eine optimale Substratbindefläche exponiert wird. Eindeutige Ergebnisse zur Substratbindung liegen leider noch nicht vor. Während Grp94 im ER alleine agieren kann, liegt HSP90 im Zytosol in einem Multiproteinkomplex vor (Young et al. [2001], Ali et al. [2006]).

Viele der HSP90 Substrate sind Kinasen. Doch wie und warum binden Kinasen an HSP90? Bezüglich der EGF Rezeptorfamilie konnte bisher gezeigt werden, dass sowohl ErbB1, als auch ErbB2 in der unreifen, ER-ständigen Form, HSP90 binden und Geldanamycin-abhängig abgebaut werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Abbau von ErbB2 abhängig von dem Cochaperon CHIP war, das gleichzeitig als ER-ständige Ubiquitin-E3-Ligase fungiert (Xu et al. [2002]). HSP90 spielt demnach eine wichtige Rolle in der Reifung von EGF Rezeptoren. Sind die Rezeptoren fertig gereift und an der Plasmamembran, so entdeckt man Unterschiede in der Geldanamycin-Empfindlichkeit. Während ErbB1 unsensitiv ist, wird ErbB2 nach HSP90 Inhibition abgebaut. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten den  $\alpha$ C- $\beta$ 4 loop im N-terminalen Kinaselappen von ErbB2 als Bindestelle für den HSP90-Chaperonkomplex identifizieren. Xu et al. konnten dabei zeigen, dass die elektrostatische Natur des loops wichtig für die Bindung ist (Xu et al. [2005]). Der  $\alpha$ C- $\beta$ 4 loop fungiert bei der Kinaseaktivierung wie ein "Scharnier", das die Bewegung des N-terminalen relativ zum C-terminalen Kinaselappen ermöglicht. Aber nicht nur

ErbB2, sondern auch aktivierende Punktmutanten von ErbB1, Raf, aber auch FLT-3 Mutanten werden HSP90-abhängig (Shimamura et al. [2005], Minami et al. [2002]). Es könnte sein, dass diese Kinasen, die in einer aktiven Konformation vorliegen, hydrophobe Flächen nach außen projizieren, vor allem wenn kein ATP gebunden ist. Damit können sie strukturell instabil sein, wenn HSP90 nicht gebunden wird (Xu et al. [2005], Prince and Matts [2005]).

Sehr häufig wird in Kinase-HSP90 Komplexen auch das 50 kDa große Chaperon Cdc37 gefunden und es ist wahrscheinlich, dass Cdc37 die Bindung von Kinasen an HSP90 vermittelt. Cdc37 kann die ATPase Funktion von HSP90 blockieren und damit die Substratbindung ermöglichen (Roe et al. [2004]). Cdc37 hat selber Chaperonfunktion. Deletiert man nämlich die HSP90 Bindestelle, so kann es trotzdem noch v-Src in Hefen stabilisieren (Lee et al. [2002]).

## 1.5 Transport zur Membran

Wie bereits erwähnt, binden fertig gefaltete Proteine an den Cargo-Rezeptor ERGIC-53. ERGIC-53 ist ein Typ-I Transmembranprotein und pendelt zwischen ER und ERGIC(ER-GOLGI-intermediate compartment)-Vesikeln hin und her. Sein zytoplasmatischer Schwanz enthält Bindestellen für COP-I und COP-II Proteine. ER-Vesikel die in Richtung GOLGI-Apparat transportiert werden, werden durch den COP-II Hüllproteinkomplex abgeschnürt. Retrograder Transport von GOLGI nach ER involviert eine COP-I Hülle (Appenzeller et al. [1999]).

Beim Durchlaufen der Zisternen von cis- nach trans-GOLGI wird die Glykanstruktur der Glykoproteine weiter modifiziert. In einem ersten Schritt spaltet die GOLGI  $\alpha$ -Mannosidase I terminale Mannosereste bis zu einer  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Struktur ab. In weiteren Schritten kreieren N-Acetylglukosamintransferasen I und II, sowie die GOLGI  $\alpha$ -Mannosidase II eine  $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ -Struktur, die Basis für weitere Glykosylierungsschritte ist. "Strukturzucker" innerhalb der Arme A-C sind meist  $\beta$ -glykosidisch verknüpft, während terminale, "verzierende" Zucker  $\alpha$ -glykosidisch verknüpft sind, was zur Folge hat, dass diese aus der Glykanstruktur



herausragen und damit gut für Lektine und Antikörper zugänglich sind (s. Abb. 1.7). An der Plasmamembran angelangt, ragt die Extrazellulärdomäne des Rezeptors nun in den extrazellulären Raum und kann Liganden binden. Die Glykanstruktur kann dabei einen Beitrag zur Ligandbindung, aber auch zur Dimerisierung und Aktivität der Rezeptortyrosinkinase leisten (siehe auch Diskussion).

Wie bereits beschrieben, sind dimerisierte Rezeptortyrosinkinasen aktiv und phosphoryliert. Die Phosphorylierung spielt dabei eine positive Rolle bei der Aktivierung. Eine Rezeptordephosphorylierung hat fast immer einen deaktivierenden Effekt und schafft so ein fein reguliertes Gleichgewicht zwischen aktivem, phosphorylierten und inaktiven, dephosphorylierten Zustand. Die negativen Regulatoren in diesem Zusammenspiel sind dabei die Proteintyrosinphosphatasen (PTPasen). Neben PTPasen spielt die kontrollierte Endozytose und anschließende Degradation von Rezeptortyrosinkinasen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der negativen Regulation der Rezeptoraktivität.

## 1.6 Kontrolle durch PTPasen

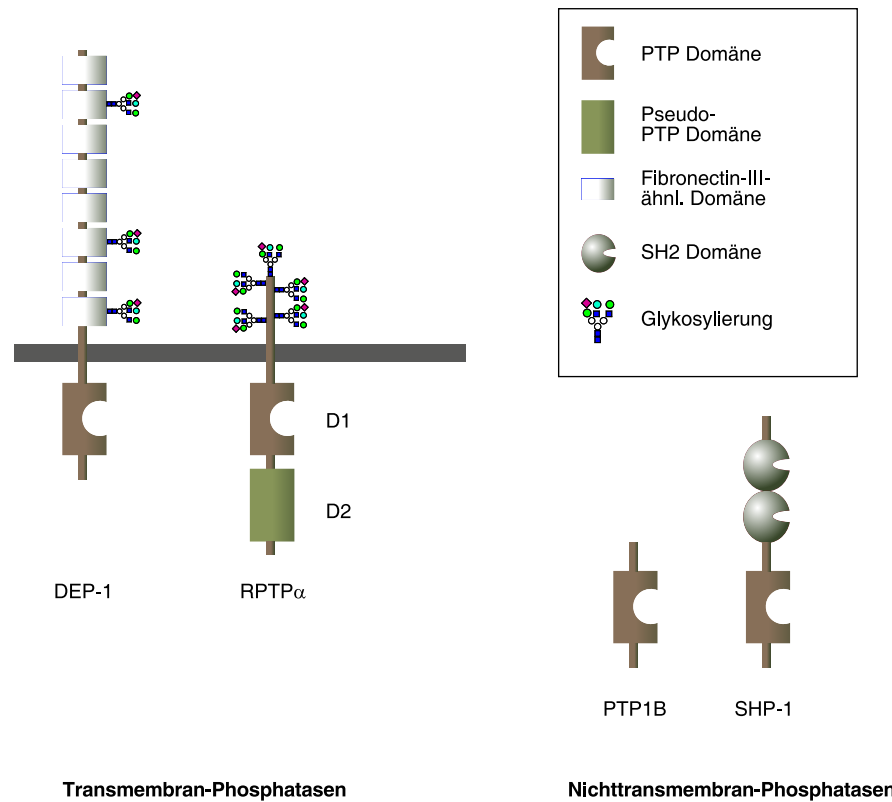
Proteintyrosinphosphatasen können in Transmembran-, bzw. Rezeptor-ähnliche, und Nicht-Transmembran- Phosphatasen unterteilt werden. Allen gemeinsam ist eine strukturell konservierte Phosphatasedomäne mit dem hochkonservierten Motiv  $\text{HCX}_5\text{R}$  im aktiven Zentrum. Das Cystein fungiert dabei als Nukleophil während der Katalyse (Tonks [2006]). Mutiert man das Cystein zu Serin, so ändert sich die Struktur der Phosphatasedomäne kaum und können Substrate nach wie vor gebunden werden, die Phosphatase ist aber katalytisch inaktiv.

### PTP1B

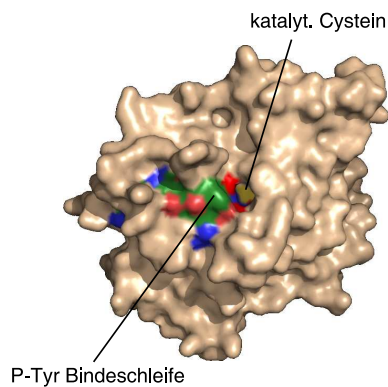
PTP1B ist eine ubiquitär exprimierte Phosphatase, die hauptsächlich aus einer Phosphatasedomäne und einer Prolin-reichen C-terminalen Region besteht. Durch unterschiedliches Spleißen und proteolytische Modifikationen existiert PTP1B in verschieden großen Isoformen. Durch seinen C-terminalen hydrophoben Schwanz ist



A



B



C

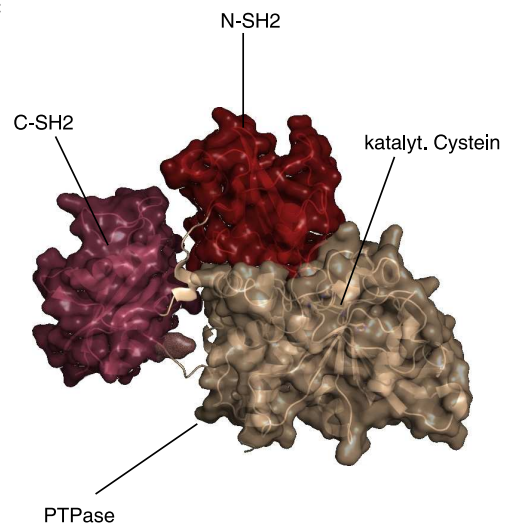


Abbildung 1.14: **A: Einteilung und Domänenstruktur einiger PTPasen.** (nach Ostman et al. [2006]) **B: Oberflächenstruktur von PTP1B.** (PDB entry: 1SUG) In Grün die Phosphotyrosin-erkennende Schleife. In Gelb ist das invariante Cystein am Boden des katalytischen Zentrums zu erkennen. **C: Hemmung von SHP-1 durch Bindung der N-terminalen SH2-Domäne an die katalytische Domäne.** Bindung von Phosphopeptiden an die nach außen zeigende Peptidbindetasche der N-SH2 Domäne, lässt diese von der katalytischen Domäne abdissoziieren, die nun aktiv und frei zugänglich für Substrate ist. (PDB entry: 2B30)

PTP1B exklusiv an der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums verankert. Trotzdem kann PTP1B Plasmamembran-ständige Rezeptortyrosinkinasen wie PDGF Rezeptor, EGF Rezeptor und Insulinrezeptor nach Ligandenstimulierung dephosphorylieren. Untersuchungen von Haj et al. zeigen, dass dies an der Oberfläche des ER geschieht, nachdem die Rezeptoren in Vesikeln internalisiert wurden (Haj et al. [2002]). Neuere Untersuchungen zeigen, dass das ER auch bei höheren Eukaryoten bis unterhalb der Plasmamembran ausgedehnt ist. BRET<sup>1</sup>- und FRET<sup>2</sup>-Experimente haben gezeigt, dass eine katalytisch inaktive PTP1B D181A-Mutante bereits in unstimulierten Zellen mit dem Insulinrezeptor interagiert. Zellfraktionierungen zeigten, dass diese Interaktion am endoplasmatischen Retikulum statt findet (Issad et al. [2005]). Es besteht demnach die Möglichkeit, dass PTP1B eine Autophosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen während der Biosynthese verhindert. Interessanterweise spielt PTP1B auch eine aktive Rolle bei der Signalerzeugung nach ER-Stress (Gu et al. [2004]) und wurde ER-Stress vor kurzem mit Typ-2 Diabetes in Zusammenhang gebracht (Ozcan et al. [2006]). Es ist also auch denkbar, dass PTP1B eine Rolle in einer zusätzlichen Ebene der ER-Qualitätskontrolle spielt.

Auffallendster Phänotyp von *Ptp1b*<sup>-/-</sup> Mäusen ist eine Insulin-Hypersensitivität. Mäuse mit einem *Trp53* und *Ptp1b* Doppellknockout zeigen eine erhöhte Anfälligkeit B-Lymphome zu entwickeln, was darauf hindeutet, dass PTP1B Substrate dephosphoryliert, die eine aktive Rolle in der B-Lymphopoese spielen.

## SHP-1

Die Familie der SH2-Domänen enthaltenden PTPasen umfaßt die Mitglieder SHP-1 und SHP-2. Die SH2-Domänen dienen zur Rekrutierung an tyrosinphosphorylierte Substrate, aber auch der Regulation der Phosphataseaktivität (s. Abb. 1.14). Die Expression von SHP-1 beschränkt sich auf hämatopoetisches und epitheliales Gewebe. SHP-1 reguliert u.a. Wachstumsfaktorrezeptoren wie M-CSF Rezeptor und c-Kit, die eine wichtige Rolle in der Hämatopoese spielen (Chen et al. [1996], Koz-

---

<sup>1</sup>bioluminescence resonance energy transfer

<sup>2</sup>fluorescence resonance energy transfer

lowski et al. [1998]). Obwohl zytoplasmatisch exprimiert, akkumuliert SHP-1 in einer perinukleären Region innerhalb der Zelle (Tenev et al. [2000]).

### **PTP-PEST**

Hauptmerkmal der zytoplasmatischen PTPase PTP-PEST ist eine Prolin-reiche C-terminale Domäne, die sg. PEST-Domäne, die Bindestelle v.a. für SH3-Domänen interagierender Proteine ist. Obwohl PTP-PEST ubiquitär exprimiert ist, ist das Knochenmark das Gewebe mit der höchsten Expression. Die homologe murine PTPase PEP (PEST domain-enriched tyrosine phosphatase) ist exklusiv in hämatopoetischen Zellen exprimiert und spielt eine Rolle bei der Regulation von Effektor T-Zellen (Hasegawa et al. [2004]). Innerhalb der Zelle ist PTP-PEST im gesamten Zytoplasma zu finden.

### **RPTP $\alpha$**

RPTP $\alpha$  ist ein Vertreter der transmembranen Proteintyrosinphosphatasen. So wie die meisten Mitglieder dieser Klasse besitzt RPTP $\alpha$  zwei Phosphatasedomänen (D1 und D2 in Abb.1.14), wobei jedoch die C-terminale Domäne nur sehr geringe Phosphataseaktivität aufweist und eher der Substratbindung und Regulation dient (Tonks [2006]).

Obwohl die extrazelluläre Domäne nur 123 Aminosäuren umfaßt, ist sie stark O-, als auch N-glykosyliert. Sie dient u.a. der Ligandenbindung. Innerhalb der Zelle ist RPTP $\alpha$  hauptsächlich an der Plasmamembran zu finden.

## 1.7 Zielstellung der Arbeit

Eigene Beobachtungen und Befunde anderer Arbeitsgruppen hatten gezeigt, dass FLT-3 ITD in verschiedenen Zelllinien überwiegend als 130 kDa Spezies vorliegt. Ko-Expression der PTPase SHP-1 hatte die verstärkte Bildung zur Folge. Es bestand daher die Vermutung, dass die Reifung und Lokalisation von FLT-3 ITD Phosphotyrosin-abhängig verändert ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Hypothese zu prüfen. Es sollte mit unterschiedlicher Methodik herausgearbeitet werden, ob und an welcher Stelle die Reifung blockiert, ob diese Blockade Phosphotyrosin-abhängig und für Rezeptortyrosinkinasen generell gültig ist. Des weiteren sollte der zugrunde liegende molekulare Mechanismus näher beleuchtet und eine Beteiligung von Proteintyrosinphosphatasen an der Reifung von FLT-3 untersucht werden. Ausgehend von den gewonnenen Daten sollte nach alternativen pharmakologischen Ansätzen zur Hemmung von FLT-3 ITD gesucht werden.

## Kapitel 2

# Material und Methoden

*“ ‘Aus diesem unanfechtbaren Experiment’, rief er aus ‘habe ich die Existenz des Absoluten abgeleitet! Eine allen Schöpfungen gemeinsame Substanz, die durch eine unvergleichliche Kraft abgewandelt wurde, das ist die klare und einleuchtende Stellung des Problems, das uns das Absolute aufgibt, und das mir erforschbar erschien.’ ”*

aus: Honoré de Balzac, Die Suche nach dem Absoluten

Die experimentelle Vorgehensweise ist größtenteils unter Schmidt-Arras et al. [2005], Anhang E, aufgeführt. Im folgenden sind Methoden und Materialien beschrieben, die in weiteren Arbeiten erforderlich waren, oder besonders genau dargestellt werden sollten.

### 2.1 Materialien und Reagenzien

Synthetische siRNAs waren von Invitrogen (BLOCK-IT siRNA, außer Cdc37, Stealth siRNA; Sequenzen siehe 2.1). DNA-Oligonukleotide waren von Genosys/Sigma. sCNX-pGEX wurde freundlicherweise von David B. Williams (University of Toronto, Canada) bereitgestellt. Bacitracin (A0623) war von Applichem. Miglustat (N-Butyldeoxynojirimycin) wurde freundlicherweise bereitgestellt von Actelion (Aschwill, Schweiz). SU11248 wurde freundlicherweise von Marie O’Farrel (Sugen, Inc.) bereitgestellt. L-Glutathion (G4251), MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) (M2128), N-Ethylmaleinimid (E3876), poly-L-Lysin (P1274) waren von Sigma. Redivue PRO-MIX <sup>35</sup>S in-vitro labeling kit (SJQ0079) und Glutathion-

Name	Sequenz <sup>a</sup>	Target	Pos. <sup>b</sup>	Referenz
siCtrl	UUC UCC GAA CGU GUC ACG U dTdT	Kontrolle	-	Qiagen
siCNX	UGU GGU GGU GCC UAU GUG A dTdT	Calnexin	536	Swanton et al. [2003]
siCRT	GGA GCA GUU UCU GGA CGG A dTdT	Calreticulin	134	Helbling et al. [2004]
siERp57	AUA GUC CCA UUA GCA AAG G dTdT	ERp57	318	Hetz et al. [2005]
siBiP	GGU GGU UGU AAA GAA AAC U dTdT	Grp78/BiP	558	J.Aguirre-Ghiso
siCdc37	ACA GAU CAA GCA CUU UGG CAU GCU U	Cdc37	511	Shang and Tomasi [2006]

<sup>a</sup>sense Strang von 5' → 3'<sup>b</sup>Bezogen auf die mRNA

Tabelle 2.1: siRNA Sequenzen

Sepharose 4B (27-4574-01) waren von Amersham Biosciences. Geldanamycin (ALX-380-054) war von Alexxis. FLT-3 Ligand war von Peprotech. Castanospermin (#0759) und Deoxynojirimycin (#1258) waren von Tocris. HiPerfect (#301704) war von Qiagen. Zellkulturmedien und fötales Kälberserum waren, wenn nicht anders angegeben von PAA. Dreidimensionale Strukturmodelle und Analyse des Oberflächenpotentials wurden mit PyMol v0.99 von DeLano Scientific (<http://www.pymol.org>) durchgeführt. Densitometrische Untersuchungen erfolgten mit ImageJ v1.36b (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

## 2.2 Zelllinien

Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. In Tab. 2.2 sind Ursprung und Kulturmedium der verwendeten Zelllinien aufgelistet

	Zelllinie	Medium	Supplement
HEK293	humane embryonale Nierenzellen; fibroblastenähnlich	DMEM/F12+10 % FCS	
	<i>stabil transfizierte Sublinien:</i>		
HEK293 hFLT-3 WT		selektiert mit 150 µg/ml Hygromycin B	
HEK293 hFLT-3 ITD		selektiert mit 150 µg/ml Hygromycin B	
HEK293 hPDGFβR-HA		selektiert mit 500 µg/ml G418	
EOL-1	humane Blasten einer akuten myeloischen Leukämie mit eosinophiler Ausprägung	RPMI 1640 (PAA) +10 % FCS (hitzeinaktiviert)	
MV4-11	myelo-monozytäre AML-Blasten (FAB M5)	RPMI 1640 (PAA) +10 % FCS (hitzeinaktiviert)	
THP-1	myelo-monozytäre AML-Blasten	RPMI 1640 (PAA) +10 % FCS (hitzeinaktiviert)	
CEM	T-lymphoblastoide Linie aus der Maus	DMEM (PAA) +10 % FCS (hitzeinaktiviert)	
CEM.NKR	CNX <sup>-/-</sup> Sublinie von CEM	DMEM (PAA) +10 % FCS (hitzeinaktiviert)	
32D	Mäuseknochenmarkzellen; etabliert aus Langzeitkultur von Friend murine leukemia virus infizierten C57BL/6J-Mäuseknochenmarkkultur	RPMI 1640 (Biochrom) +10 % FCS (Biowest, hitzeinaktiviert)	2.5 ng/ml Il-3
	<i>stabil transfizierte Sublinien:</i>		
32D hFLT-3 ITD		selektiert mit 15 µg/ml Blastocidin S	
32D hFLT-3 WT		selektiert mit 15 µg/ml Blastocidin S	
32D h/mFLT-3 ITD		selektiert mit 15 µg/ml Blastocidin S	
32D mFLT-3 WT		selektiert mit 15 µg/ml Blastocidin S	

Tabelle 2.2: Verwendete Zellen, Zelllinien und Kulturmedien

## 2.3 Verwendete Puffer

### Lysepuffer

50 mM	HEPES, pH7.4
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
2 mM	EGTA
1 %	Triton X-100
20 $\mu$ M	ZnAc
10 mM	Na-pyrophosphat
50 mM	NaF

### Lysepuffer für Co-IP

50 mM	HEPES, pH7.4
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
2 mM	EGTA
0.5 %	NP-40

---

*Vor Benutzung frisch dazu:*

1 mM	PMSF <sup>a</sup>
1 $\mu$ g/ml	Pepstatin A
2 $\mu$ g/ml	Aprotinin
10 $\mu$ g/ml	Leupeptin
1 mM	Na-orthovanadat

---

<sup>a</sup>Phenylmethylsulfonylfluorid

### HNGT

20 mM	HEPES, pH7.5
150 mM	NaCl
10 %	Glycerin
0.1 %	Triton X-100

### NETG

150 mM	NaCl
5 mM	EDTA
50 mM	Tris·HCl, pH 7.5
0.02 %	Tween-20
0.04 %	Gelatine

### Kinasepuffer

50 mM	HEPES, pH 7.4
5 mM	MnCl <sub>2</sub>
100 $\mu$ M	Na-orthovanadat

## 2.4 Mutagenese

Punktmutanten von humanem FLT-3 wurden mit der Stratagene Quikchange Methode erzeugt. Verwendete Primersequenz und Annealingtemperatur siehe Tab.2.4. Die Mutationen wurden durch Sequenzierung verifiziert. Sequenzierprimer siehe Tab.2.5.



Antikörper		Epitop	Quelle	Konzentration
anti-FLT-3 (C-20)	Kaninchen PC <sup>a</sup>	C-Terminus	Lars Rönnstrand	125 ng/ml
anti-FLT-3 (S-18)	Kaninchen PC	Kinase Insert	Lars Rönnstrand	125 ng/ml
anti-pY591	Kaninchen PC	pY591-FLT3	Cell Signalling	1:1000
anti-pY (4G10)	Maus MC <sup>b</sup>			1:5000
anti-CNX (C-20)	Ziege PC	C-Terminus	Santa Cruz	200 ng/ml
anti-CNX (H-70)	Kaninchen PC	N-Terminus	Santa Cruz	200 ng/ml
anti-CRT (C-17)	Ziege PC	C-Terminus	Santa Cruz	200 ng/ml
anti-Cdc37 (clone 15)	Maus MC	N-Terminus	BD Biosciences (Kat.Nr.610576)	250 ng/ml
anti-ERp57	Maus MC	ganzes Protein	Stressgen (Kat.Nr. SPA-725)	270 ng/ml
anti-BiP (N-20)	Ziege PC	N-Terminus	Santa Cruz	80 ng/ml
anti- $\beta$ -Actin (AC-15)	Maus MC	N-Terminus	Sigma	1:5000
anti-Vinculin	Maus MC		Biozol (Kat.Nr. BZL03106)	1:5000
anti-SHP-1 (C-19)	Kaninchen PC	C-Terminus	Santa Cruz	50 ng/ml
anti-HA (6E2)	Maus MC		Cell Signalling	1:1000
anti-c-Kit (C-19)	Kaninchen PC	C-Terminus	Santa Cruz	200 ng/ml
anti-GFP (B-2)	Maus MC	N-Terminus	Santa Cruz	1 $\mu$ g/ml
anti-VSV (P5D4)	Maus MC	C-Terminus	Sigma	1:5000
anti-panERK	Maus MC			125 ng/ml
anti-Src (SRC 2)	Kaninchen PC	C-Terminus	Santa Cruz	66 ng/ml

<sup>a</sup>polyklonal<sup>b</sup>monoklonal

Tabelle 2.3: Verwendete Antikörper-Verdünnungen

## 2.5 siRNA-Oligo Transfektion

12-well Platten wurden mit 50  $\mu$ g/ml Poly-L-Lysin in PBS für eine Stunde bei 37 °C beschichtet und anschließend einmal mit sterilem PBS gewaschen. Stabil transfierte HEK293 Zellen wurden mit einer Dichte von ca. 300.000 Zellen/ml ausgesät und 24 Stunden später transfiziert. Für ein well bedeutete dies:

100  $\mu$ l DMEM ohne Serum

+ 0.6  $\mu$ l siRNA

*beides wurde zusammen gut gemischt*

+ 6  $\mu$ l HiPerfect

*es wurde noch einmal gemischt und für 5-10 min. bei RT inkubiert.*

Das Gemisch wurde Tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden danach mit dem Transfektionsmix bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 100-150  $\mu$ l Lysepuffer lysiert und  $\frac{1}{5}$  des Lysats mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert. Die Endkonzentration an siRNA betrug 5 nM.

Mutation	Primersequenz	Anneal.temp.
K644A	CA ATC CAG GTT GCC GTC <b>GCA</b> ATG CTG AAA GAA AAA G	60 °C
N676K	C GAG AAT GTG <b>AAG</b> CTG CTG GGG GCG TGC	68 °C
Y842C	C ATG AGT GAT TCC AAC <b>TGT</b> GTT GTC AGG GGC AAT G	68 °C
R931A	GCT TTT GAC TCA <b>GCG AAA CGG</b> CCA TCC TTCC	68 °C
K932A/R933A	CT TTT GAC TCA <b>AGG GCG GCG</b> CCA TCC TTCC	60 °C

Tabelle 2.4: Primersequenzen zur *in-vitro* Mutagenese PCR.

Mutation	Primernamen	Primersequenz
K644A	seqKA	TTG TCT CCT CTT CAT TGT CG
N676K	ITD	GGT ACA GGT GAC CGG CTC CTC
Y842C	F4	CAC TGT CAG GAC CAA TTT AC
R931A	F5	GAC TTT GGA TTG GCT CGA G
K932A/R933A	F5	dto.

Tabelle 2.5: Sequenzierprimer für FLT-3 Mutanten.

## 2.6 Aufreinigung von GST-CNX

*E.coli Rosetta* wurden nach der KCM-Methode mit pGEX-sCNX oder pGEX-sCNX E217A transformiert. Einzelklone wurden gepickt und in einer 5 ml Übernachtskultur (LB+100  $\mu$ g Ampicillin) kultiviert. Die Übernachtskultur wurde in 500 ml LB-Medium überführt und die Kultur bis zu einer  $OD_{600nm}=0.7$  wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit 250  $\mu$ M IPTG induziert und bei Raumtemperatur über Nacht geschüttelt. Die Bakterien wurden bei 3,500xg abzentrifugiert und in 10 ml TBN150(25 mM Tris, pH7.5, 150 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ - Mercaptoethanol+Proteaseinhibitoren) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dreimal einem Zyklus von Einfrieren in flüssigen Stickstoff und anschließendem Auftauen bei 37 °C, unterworfen. Anschließend wurde die Zellsuspension zunächst mit 0.5 mg/ml Lysozym für 20 min bei Raumtemperatur und anschließend mit 14 mM EDTA und 0.35 % Triton X-100 für 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Das Bakterienlysat wurde für 30 min. bei 4 °C und 100,000xg(30,000 rpm) in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Das geklärte Bakterienlysat wurde dann mit 1 ml gewaschener GSH-Sepharosebeads für eine Stunde bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die beads vier mal mit 10 ml TBN150+1 % Triton X-100 für

jeweils 10 min bei 4 °C gewaschen und dann die GST-Fusionsproteine in 3 ml Elutionspuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH8, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 7.7 mg/ml GSH) eluiert. Die Hälfte Eluat wurde mit 20 % Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die andere Hälfte wurde über Nacht bei 4 °C gegen 50 mM Tris, pH8, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> dialysiert und mit 20 % Glycerin wie oben beschrieben eingefroren.

## 2.7 Pulldown mit GST-CNX

20·10<sup>6</sup> MV4-11 Zellen wurden in 1 ml Lysepuffer (0.5 % NP-40, ohne EGTA/EDTA, mit 5 mM Ca<sup>2+</sup>) lysiert und das Lysat auf drei Eppendorfröhrchen aufgeteilt. Lysat wurde mit 50 µg GST-CNX oder GST-CNX E217A und 30 µl gewaschener GSH-Sepharosebeads über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die beads dreimal mit HNGT (+5 mM Ca<sup>2+</sup>) gewaschen und in 30 µl 2xSDS-PAGE Probenpuffer gekocht. Aliquote des Überstands wurden zur Expressionskontrolle von FLT-3 abgenommen. Überstandaliquote und GSH-Sepharosebeads wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und assoziiertes FLT-3 im Immunoblot detektiert.

## 2.8 Inhibitor-Behandlungen

### Geldanamycin

HEK293 Zellen wurden in 12-well Platten ausgesät und am nächsten Tag mit Expressionskonstrukten für FLT-3 mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Das Transfektionsmedium wurde nach acht Stunden gegen DMEM/F12+10 % FCS gewechselt und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für sechs Stunden mit 3 µM Geldanamycin inkubiert, wobei die DMSO-Konzentration 1 % betrug. Kontrollzellen wurden mit gleicher Menge an DMSO alleine behandelt. Nach Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 150 µl Lysepuffer pro well lysiert und die Expression von FLT-3 in  $\frac{1}{5}$  der

Lysatmenge im Immunoblot analysiert. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit 250 nM Geldanamycin und Behandlungszeiten von drei Stunden erzielt.

### **N-Ethylmaleinimid und Bacitracin**

12-well Platten wurden für eine Stunde mit 50  $\mu\text{g/ml}$  poly-L-Lysin in PBS bei 37 °C inkubiert und anschließend einmal mit sterilem PBS gewaschen. Stabil transfizierte HEK293 Zellen wurden auf die beschichteten Platten bei einer Dichte von 250,000-300,000 Zellen/ml ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 100  $\mu\text{M}$  N-Ethylmaleinimid oder 1 mM Bacitracin inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit 100-150  $\mu\text{l/well}$  Lysepuffer lysiert. Das zugegebene Volumen an NEM betrug  $\frac{1}{2000}$  und an Bacitracin  $\frac{1}{100}$  des Kulturvolumens. Als Kontrollen diente DMSO (für NEM) oder Wasser (für Bacitracin) alleine.

Alternativ wurden MV4-11 oder EOL-1 Zellen bei einer Dichte von  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml in 12-well Platten mit 100  $\mu\text{M}$  NEM oder 1 mM Bacitracin behandelt. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten bei 500xg abzentrifugiert, einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 500  $\mu\text{l}$  Lysepuffer lysiert. 50  $\mu\text{l}$  Lysat wurden sofort mit 6x SDS-PAGE Probenpuffer gekocht, der Rest mit 0.7  $\mu\text{g}$  anti-FLT-3 (S-18) und 30  $\mu\text{l}$  Protein-A Sepharose-Suspension über Nacht auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Die Protein-A Sepharose beads wurden dreimal mit 500  $\mu\text{l}$  eiskaltem HNGT gewaschen und in 30  $\mu\text{l}$  2x SDS-PAGE Probenpuffer gekocht,

Die Expression der Rezeptortyrosinkinasen wurde in  $\frac{1}{5}$  des Lysats im Immunoblot analysiert.

### **Castanospermin, Deoxynojirimycin, Miglustat**

EOL-1, MV4-11 oder 32D hFLT-3 ITD Zellen wurden mit Inhibitoren behandelt. Dazu wurden jeweils  $5 \cdot 10^6$  Zellen für drei Stunden mit den angegebenen Konzentrationen an Castanospermin, Deoxynojirimycin oder Miglustat bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Als Kontrolle diente die Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor 1  $\mu\text{M}$  SU11248. Anschließend wurden die Zellen bei 500xg abzentrifugiert, einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 500  $\mu\text{l}$  Lysepuffer lysiert. Das Lysat wurde mit

0.7  $\mu$ g anti-FLT-3 (S-18) und 30  $\mu$ l Protein-A Sepharose-Suspension über Nacht auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Die Protein-A Sepharose beads wurden dreimal mit 500  $\mu$ l eiskaltem HNGT gewaschen und in 30  $\mu$ l 2x SDS-PAGE Probenpuffer gekocht, Expression und Tyrosinphosphorylierung von FLT-3 wurden im Immunoblot analysiert.

## 2.9 MTT Proliferationsassay

Stabil transfizierte 32D Zellen wurden zweimal mit Il-3 freiem Medium gewaschen und entweder in Il-3 freiem Medium oder in Medium mit 2.5 ng/ml Il-3 resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden bei einer Dichte von 250,000 Zellen/ml mit unterschiedlichen Konzentrationen an Castanospermin, Miglustat oder Bacitracin versetzt und in 96-well Platten ausgesät (100  $\mu$ l Zellsuspension/well), wobei die zugegebene Menge an Inhibitorlösung immer 1 % des Kulturvolumens betrug. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen mit 0.5 mg/ml MTT (Endkonzentration) versetzt und für vier Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l/well Solubilisierungspuffer (10 % SDS, 0.01 M HCl) aufgeschlossen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Bildung des violetten Formazansalzes bei 570 nm im Plattenphotometer gemessen. Der Mittelwert und die Standardabweichung aus acht Parallelwerten wurde bestimmt und in einem Graphen als relatives Wachstum in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle dargestellt.

## 2.10 in-vitro Kinasesassays

### Autophosphorylierungsassay

HEK293 Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Flaschen ausgesät und am nächsten Tag mit Expressionskonstrukten für HA-getaggtetes FLT-3 WT oder FLT-3 ITD nach der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Pro Konstrukt wurden zwei Flaschen transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen in 1 ml Lysepuffer (0.5 % NP-40, kein ZnAc oder NaF) pro Flasche lysiert. Die jeweiligen Lysate wurden

kombiniert und FLT-3 mit 4  $\mu\text{g}$  anti-HA und 200  $\mu\text{l}$  Prot.A-Sepharosesuspension über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad immunopräzipitiert. Die Sepharosebeads wurden dreimal mit jeweils 3 ml HNGT Puffer gewaschen, jeweils auf vier Eppendorfröhrchen aufgeteilt, noch zweimal mit 500  $\mu\text{l}$  Kinasepuffer gewaschen und in 30  $\mu\text{l}$  Kinasepuffer resuspendiert. Die beads wurden mit den Inhibitoren (+4  $\mu\text{l}$  Castanospermin oder Deoxynojirimycin; 100 mM Stammlösung) für 30 min. auf Eis inkubiert und die Kinasereaktion durch die Zugabe von 2.5  $\mu\text{Ci}$  (in 6  $\mu\text{l}$ )  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP gestartet. Der Reaktionsansatz wurde bei 30 °C geschüttelt und nach 20 min. durch die Zugabe von 6xSDS-PAGE Probenpuffer gestoppt und anschließend für 10 min. gekocht. Die Menge an radioaktiver Inkorporation wurde mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

### **Assay mit exogenem Peptidsubstrat**

GST-FLT-3, das die zytoplasmatische Domäne von FLT-3 WT mit einem GST-Tag fusioniert enthielt, war von A.Uecker aus Sf9-Zellen aufgereinigt worden. Als exogenes Substrat diente das Peptid KY751 (KKKSKDESVDYVPMLDMKG), das neben drei basischen Lys-Resten eine den Autophosphorylierungsort Tyr751 umgebende Sequenz aus dem PDGF $\beta$  Rezeptor enthält. Dieses Peptid war in früheren Versuchen als gutes Substratpeptid für FLT-3 identifiziert worden. In einem 50  $\mu\text{l}$  Volumen wurden 0.5  $\mu\text{g}$  GST-FLT-3, 2 mM K751 Peptid und 1 mM Castanospermin, Deoxynojirimycin oder Miglustat in Kinasepuffer gemischt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Die Kinasereaktion wurde durch die Zugabe von 3.2  $\mu\text{Ci}$  [ $^{32}$ ]P- $\gamma$ -ATP gestartet und bei 30 °C und Schütteln für 20 min. inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 und 20 min. wurden 20  $\mu\text{l}$  Aliquote genommen und die Reaktion durch 1 mg/ml BSA und 250 mM EDTA gestoppt. GST-FLT-3 und BSA wurden durch 6 % Trichloressigsäure (TCA) auf Eis für 30 min. gefällt und durch Zentrifugation abgetrennt.  $\frac{1}{3}$  des Peptid-enthaltenden Überstandes wurde auf Phosphocellulose getüpfelt, getrocknet und viermal mit 75 mM Phosphorsäure für 5 min. gewaschen. Die Phosphocellulose wurde anschließend getrocknet und die radioaktive Inkorporation in die Peptide mittels Phosphoimager ausgewertet.

## Kapitel 3

# Ergebnisse

*“Es wird! Die Masse regt sich klarer  
Die Überzeugung wahrer, wahrer:  
Was man an der Natur Geheimnisvolles pries,  
Das wagen wir verständig zu probieren,  
Und was sie sonst organisieren ließ,  
Das lassen wir kristallisieren.”*

aus: J.W. von Goethe, Faust. Der Tragödie zweiter Teil.

### 3.1 FLT-3 ITD reift ineffizient.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, läßt sich Wildtyp (WT) FLT-3 im Immunoblot als unreife, 130 kDa Hochmannoseform und als komplex glykosylierte, reife 150 kDa Form detektieren. Als wir begannen, die Signalmechanismen von Wildtyp FLT-3 und FLT-3 ITD zu vergleichen, fiel uns auf, dass im Immunoblot FLT-3 ITD, i.Ggs. zu FLT-3 WT hauptsächlich in der unreifen 130 kDa Form zu detektieren ist (s.Abb.3.1 A). Um bestätigen zu können, dass die unterschiedlichen Formen, wie vermutet, aus einer unterschiedlichen Glykosylierung resultieren, unterzogen wir FLT-3 WT und FLT-3 ITD einer detaillierteren Analyse der Glykanstruktur. Während die Endoglykosidase PNGase F (manchmal auch EndoF genannt) alle N-gebundenen Glykane eines Glykoproteins abspaltet, besitzt die Endoglykosidase EndoH eine Spezifität für Hochmannose-Strukturen. Behandelte man Immunopräzipitate von FLT-3 mit PNGaseF, so war FLT-3 nun nur noch als deglykosylierte 110 kDa Form detektierbar (s. Abb.3.1 B). Behandelte man FLT-3 Immunopräzipi-

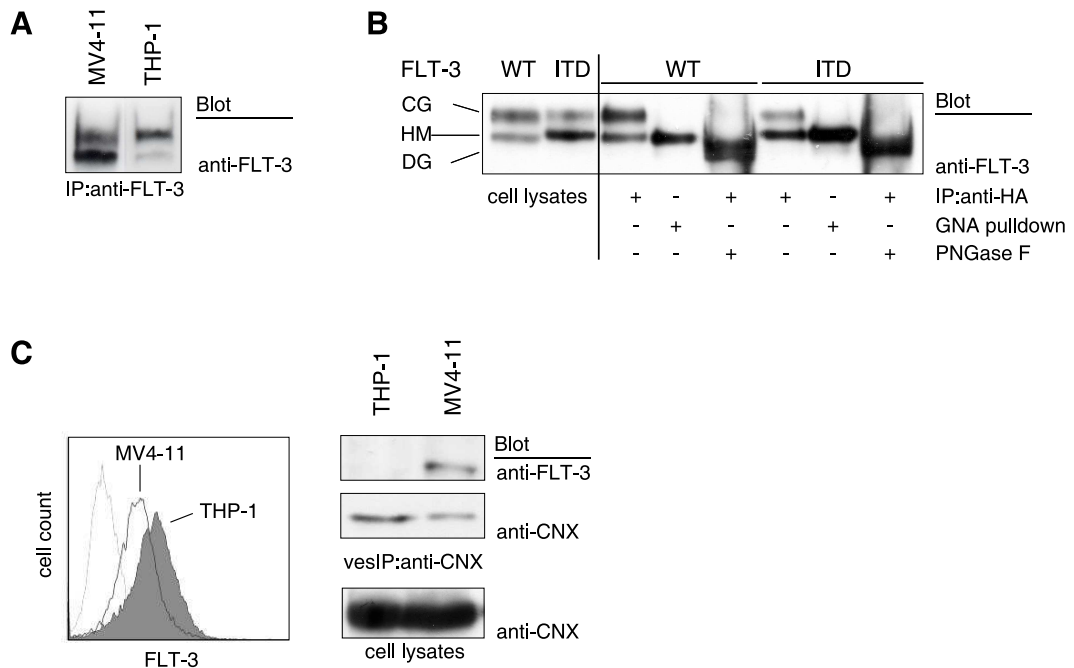
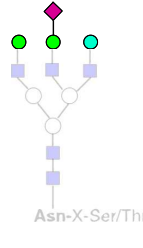


Abbildung 3.1: **Die Reifung von konstitutiv aktivem FLT-3 ITD ist gestört.** **A:** FLT-3 WT oder ITD wurden jeweils aus endogen exprimierenden THP-1 oder MV4-11 Zellen immunopräzipitiert und im Immunoblot analysiert. **B:** FLT-3 WT oder ITD wurden in HEK293 Zellen exprimiert. FLT-3 wurde immunopräzipitiert und mit PNGase verdaut oder nicht und im Immunoblot analysiert. FLT-3 Expressionsspiegel wurden im Immunoblot von Lysat-Aliquoten untersucht. Die Hochmannoseform der beiden FLT-3 Varianten wurde durch GNA-Lektinpulldowns isoliert und im Immunoblot analysiert. **C: Linke Seite:** Die Oberflächenlokalisation von FLT-3 WT bzw. ITD wurde mittels FACS-Analyse in THP-1, bzw. MV4-11 Zellen analysiert. **Rechte Seite:** ER-Membranvesikel wurden mit anti-Calnexin Antikörpern aus Homogenaten von THP-1 oder MV4-11 Zellen, die ohne die Anwendung von Detergenzien gewonnen wurden, isoliert und mittels Immunoblot auf die Anwesenheit von FLT-3 analysiert. Gleiche Expressionsspiegel von Calnexin wurde mittels Immunoblot von Lysat- Aliquoten kontrolliert.





	DBA Dolichos biflorus $\alpha$ -verkn. GalNAc	GNA Galanthus nivalis ( $\alpha$ -1,3) verkn. Man.	RCA <sub>120</sub> Ricinus communis Gal, GalNAc	SBA Glycine max terminale GalNAc	SNA Sambucus nigra NeuAc-( $\alpha$ -2,6)-Gal	UEA Ulex europaeus $\alpha$ -verkn. Fuc	Lektin Herkunft Selektivität
150 kDa Form	-	-	+++	+	+	-	150 kDa Form
130 kDa Form	-	++	-	-	-	-	130 kDa Form

■ N-Acetylglucosamin (GlcNAc) ▲ Fucose (Fuc) ● N-Acetylgalactosamin (GalNAc) ● Galactose (Gal) ◆ N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc) ○ Mannose (Man)

Abbildung 3.2: **Reaktivität der verschiedenen FLT-3 Spezies mit Lektinen in Blotting- und Pulldown-Experimenten.** FLT-3 WT oder kinaseinaktives FLT-3 WT KA wurden in COS-7 Zellen exprimiert. FLT-3 wurde aus den transfizierten COS-7 Lysaten oder aus THP-1 Zellen mit biotinylierten Lektinen und Streptavidin-beads isoliert und im Immunoblot dargestellt. Alternativ wurde FLT-3 aus Lysaten der o.g. Zellen immunopräzipitiert und mit biotinylierten Lektinen und HRP-gekoppeltem Streptavidin im Immunoblot analysiert. Zur alternativen Detektion von N-Acetylneuraminsäure (NeuAc) wurde FLT-3 aus THP-1 Lysaten immunopräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden mit Neuraminidase behandelt und die Expression im Immunoblot analysiert. Die Anwesenheit von NeuAc äußerte sich in einem reduzierten Molekulargewicht der reifen Form. Die Ergebnisse aus diesen Experimenten sind in der Tabelle mit einer semiquantitativen Skala von - (keine Evidenz) bis +++ (hohe Evidenz) dargestellt. Auf der linken Seite ist eine aus den Ergebnissen abgeleitete putative Glykanstruktur. Zuckerreste mit hoher experimenteller Evidenz sind kräftig dargestellt andere Elemente blass, in Analogie zu Literaturdaten.

tate hingegen mit EndoH, so änderte lediglich die 130 kDa Form ihr Migrationsverhalten im SDS-Gel (Daten in Anhang E gezeigt. Schmidt-Arras et al. [2005]). Diese Experimente zeigen, dass der Größenunterschied in der Tat durch unterschiedliche Glykosylierung zustande kommt und die 130 kDa Form einer Hochmannoseform entspricht. Pulldown-Experimente mit biotinyliertem GNA-Lektin, das spezifisch an Mannose bindet, konnten dieses Ergebnis bestätigen (s. Abb. 3.1 B). Um die 150 kDa Form etwas genauer zu charakterisieren, verwendeten wir weitere biotinylierte Lektine, sowohl in pulldown- Experimenten, als auch zum Immunoblotting. Dabei zeigte sich, dass die 150 kDa Form spezifisch mit den Lektinen SNA, RCA<sub>120</sub> und SBA interagierte, was auf endständige Galactose, N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure hinweist. Die Tatsache, dass das Lektin DBA, das N-Acetylglucosamin spezifisch in  $\alpha$ -glykosidischer Verknüpfung erkennt, keine Reaktivität zeigte, deutet daraufhin, dass das endständige N-Acetylglucosamin in einer  $\beta$ -glykosidischen Bindung vorliegen muss. Die Beobachtung, dass SNA mit

der 150 kDa Form interagiert, weist darauf hin, dass N-Acetylneuraminsäure in einer ( $\alpha$ -2,6) glykosidischen Verknüpfung mit nachfolgender Galaktose auftritt. Bei der Inkubation von FLT-3 Immunopräzipitaten mit Neuraminidase, kam es zu einer Größenverschiebung der 150 kDa Form im Immunoblot, was die Existenz endständiger N-Acetylneuraminsäure weiter bestätigte. Die Ergebnisse der einzelnen Experimente sind in Abb. 3.2 zusammengestellt und eine putative Glykanstruktur der 150 kDa Form abgebildet (dort auch die ausführlichen Namen der Lektine).

Es war nun also klar, dass FLT-3 ITD hauptsächlich in einer unreifen Hochmannoseform und FLT-3 WT hauptsächlich in einer komplex glykosylierten Form vorlag. Bisherigem Wissen zufolge, sind Glykoproteine mit Hochmannose-Glykanstruktur lediglich im endoplasmatischen Retikulum und cis-GOLGI anzutreffen und solche mit komplex glykosylierter Form an der Plasmamembran. Wir waren also daran interessiert, festzustellen, ob FLT-3 ITD auch in seiner Lokalisation von FLT-3 WT abweicht. Dazu untersuchten wir die Oberflächenlokalisierung von FLT-3 mittels FACS-Analyse in Zelllinien, die endogen entweder FLT-3 WT (THP-1) oder ITD (MV4-11) exprimieren. Wir stellten fest, dass auf MV4-11 Zellen weniger FLT-3 Moleküle an der Oberfläche zu detektieren waren, als in THP-1 Zellen (s. Abb. 3.1 C). Um nun zu zeigen, dass FLT-3 ITD hingegen im ER lokalisiert ist, isolierten wir Membranvesikel, die Calnexin, ein ER-residentes Transmembranprotein, enthielten. Wildtyp FLT-3 konnte dabei nicht in solchen Vesikeln isoliert werden, FLT-3 ITD hingegen schon (s. Abb. 3.1 C).

Demnach ist FLT-3 WT hauptsächlich an der Zelloberfläche lokalisiert, während FLT-3 ITD im endoplasmatischen Retikulum als unreif glykosylierte Form zurückgehalten wird.

## 3.2 Tyrosinphosphorylierung und ER Lokalisation von FLT-3 ITD

### Kinaseinaktiviertes FLT-3 ITD reift besser

Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass ITD Mutationen von FLT-3 zu einer konstitutiven Aktivierung der Kinaseaktivität führen (Kiyoi et al. [1998]). Wir fragten uns daher, ob die aberrante ER-Lokalisation von FLT-3 ITD durch seine konstitutive Aktivität bedingt ist. Um dies zu klären, wählten wir zwei verschiedene Versuchsansätze. Zunächst behandelten wir MV4-11 Zellen für drei Stunden mit den Tyrosinkinaseinhibitoren AG1296 oder SU11248 und isolierten FLT-3 durch Immunopräzipitation. Im Immunoblot konnte man in den Inhibitor-behandelten Proben eine Anreicherung der 150 kDa Form detektieren, was mit der Phosphorylierung von FLT-3 korrelierte (s. Abb.3.3 A). Den gleichen Effekt konnten wir weiterhin beobachten, wenn wir das invariante Lys644, das zur ATP-Komplexierung benötigt wird (s. Abb.1.4), zu Alanin mutierten und so die Kinase inaktivierten. Sowohl FLT-3 WT KA, als auch FLT-3 ITD KA zeigten eine Anreicherung der reifen Form. Um sicher zu gehen, dass dieser Effekt nicht auf einen reduzierten Abbau, sondern wirklich auf eine besser Reifung zurückzuführen ist, führten wir pulse-chase Experimente durch. Dabei markierten wir neu synthetisierte Proteine mit [<sup>35</sup>S]Methionin/[<sup>35</sup>S]Cystein. Nach zwanzig Minuten versetzten wir das Medium mit einem Überschuss an unmarkiertem Methionin/Cystein und verfolgten die Reifung von FLT-3 im Autoradiogramm. Bei FLT-3 WT kann man erkennen, wie innerhalb von drei Stunden die 150 kDa aus der 130 kDa Form entstand (s. Abb.3.3 C). FLT-3 ITD reifte wesentlich schlechter (Abb. 3.3 B und D) innerhalb dieses Beobachtungszeitraums. Kinaseinaktives FLT-3 ITD KA hingegen reifte sehr effizient (Abb. 3.3 D). Genauso verhielt sich auch FLT-3 ITD, das mit SU11248 gehemmt wurde (Abb. 3.3 B). Um zu sehen, ob die verbesserte Reifung auch mit einer verbesserten Oberflächenlokalisierung einhergeht, transfizierten wir COS-7 Zellen mit FLT-3 WT, FLT-3 ITD oder FLT-3 ITD KA und analysierten die Verteilung von FLT-3 innerhalb der Zelle mittels Immunohistochemie. Dabei bestätigte sich erneut, dass

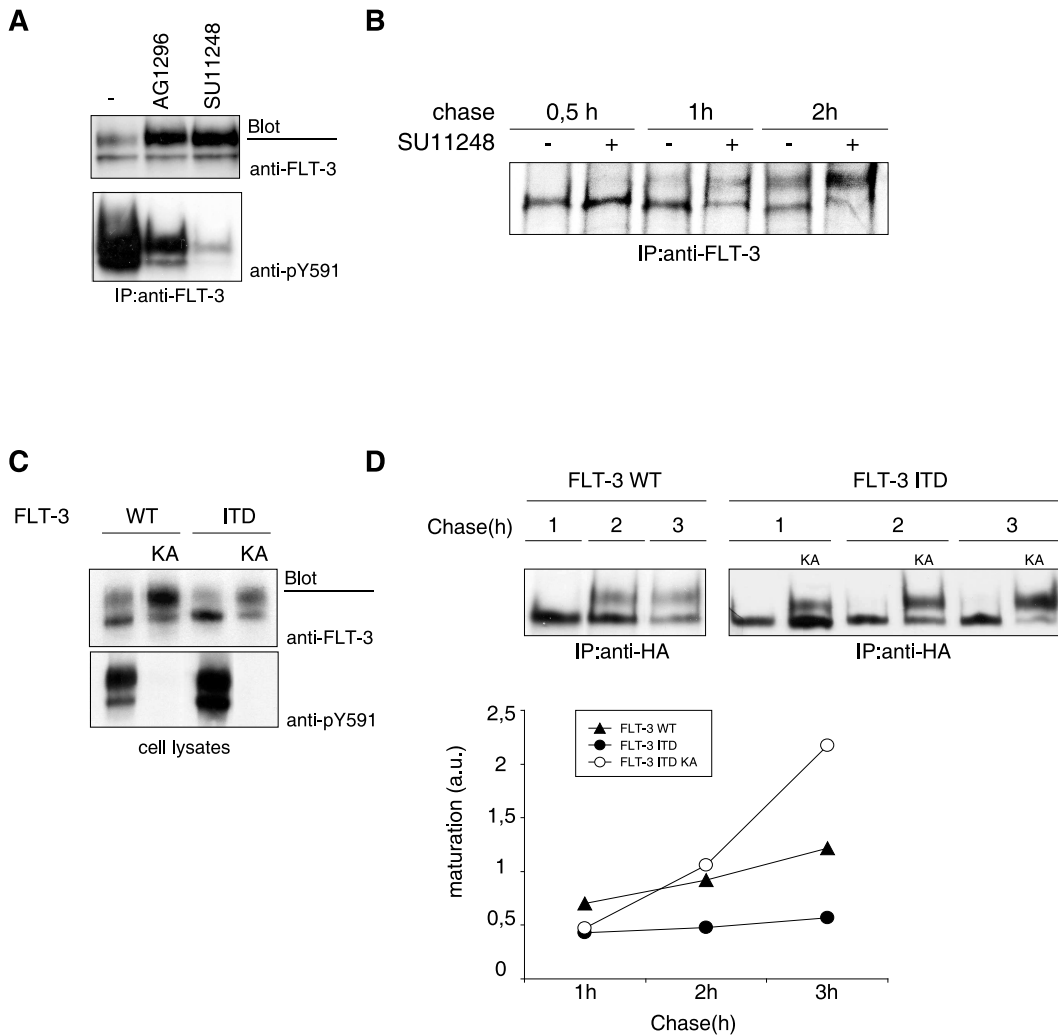


Abbildung 3.3: **Tyrosinphosphorylierung reguliert die Reifung von FLT-3.** **A:** MV4-11 Zellen wurden für drei Stunden mit den Tyrosinkinaseinhibitoren AG1296 oder SU11248 behandelt und FLT-3 immunopräzipitiert. Expression und Tyrosinphosphorylierung wurden im Immunoblot analysiert. **B:** MV4-11 Zellen wurden metabolisch für 20 min. mit [ $^{35}$ S]Methionin/[ $^{35}$ S]Cystein markiert und anschließend mit einem Überschuss an umarkiertem Methionin/Cystein im Medium versetzt (chase), entweder mit  $1\ \mu\text{M}$  SU11248 oder ohne. FLT-3 wurde zu den angegebenen Zeitpunkten immunopräzipitiert und mittels SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. **C:** FLT-3 WT, FLT-3 ITD oder die jeweiligen kinaseinaktiven K644A Mutanten wurden in COS-7 Zellen exprimiert und die Expression in Lysat-Aliquoten mittels Immunoblot untersucht. **D:** FLT-3 WT, FLT-3 ITD oder kinaseinaktives FLT-3 ITD K644A wurden in COS-7 Zellen exprimiert. Die Zellen wurden für 20 min. metabolisch mit [ $^{35}$ S]Methionin/[ $^{35}$ S]Cystein markiert. Ein Überschuss an umarkiertem Methionin/Cystein wurde zum Medium gegeben (chase). FLT-3 wurde zu den angegebenen Zeitpunkten immunopräzipitiert und die Reifung mittels SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Als Maß für die Reifung wurde das Verhältnis zwischen dem 150 kDa und dem 130 kDa-Signal ausgerechnet. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten sind im Graphen dargestellt.

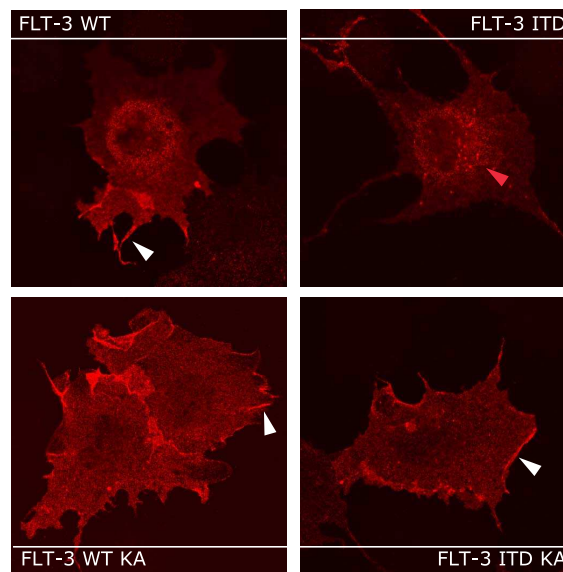


Abbildung 3.4: **Kinaseinaktiviertes FLT-3 ITD ist an der Plasmamembran lokalisiert.** FLT-3 WT, FLT-3 ITD oder die jeweiligen kinaseinaktiven K644A Mutanten wurden in COS-7 Zellen exprimiert. Die Zellen wurden fixiert und die Expression von FLT-3 mittels Immunozytochemie mit anti-FLT-3\* (gegen die Extrazellulärdomäne gerichtet) und Cy3-gefärbtem sekundärem Antikörper im Laser-Scanning Mikroskop nachgewiesen. Weiße Pfeile zeigen Membranlokalisation, rote eine perinukleäre Lokalisation an.

FLT-3 ITD im Gegensatz zu FLT-3 WT, kaum an der Plasmamembran zu finden ist. Kinaseinaktives FLT-3 ITD dagegen zeigt eine starke Plasmamembranfärbung (Abb.3.4).

Es läßt sich also beobachten, dass kinaseinaktives, dephosphoryliertes FLT-3 ITD wieder ein normales Reifungsverhalten zeigt.

### Proteintyrosinphosphatasen regulieren die Reifung von FLT-3

Wie in Kapitel 1.6 beschrieben, spielen Proteintyrosinphosphatasen (PTPasen) eine wichtige Rolle bei der Regulation und Dephosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen. Es interessierte uns deshalb, welche Rolle PTPasen bei der Reifung von FLT-3 spielen. Zu diesem Zweck koexprimierten wir FLT-3 ITD mit SHP-1 WT oder der katalytisch inaktiven CS Mutante transient in HEK293 Zellen. SHP-1 erschien uns als geeigneter Kandidat, da es überwiegend in hämatopoetischem Gewebe exprimiert wird und SHP-1 FLT-3 Homologe, wie c-Kit und M-CSFR, dephos-

phorylieren kann (Kozlowski et al. [1998], Chen et al. [1996]). Die Überexpression von SHP-1 führte zur Dephosphorylierung von FLT-3 ITD. Auch die Ausbildung der 150 kDa Form war positiv beeinflusst, was mit der Dephosphorylierung korrelierte. Beide Effekte waren abhängig von der PTPase-Aktivität, da die katalytisch inaktive CS-Mutante von SHP-1 weder einen Effekt auf die Tyrosinphosphorylierung, noch auf die Reifung von FLT-3 ITD hatte. Der reifungsfördernde Effekt von SHP-1 konnte in pulse-chase Experimenten bestätigt werden (s. Abb. 3.5).

Mittels Immunofluoreszenz untersuchten wir, ob die Überexpression von SHP-1 auch eine Auswirkung auf die zelluläre Lokalisation von FLT-3 ITD hat. Dazu exprimierten wir EGFP-getaggtetes FLT-3 ITD alleine oder zusammen mit SHP-1 WT. Um eine genauere Zuordnung der Lokalisation zu ermöglichen, koexprimierten wir noch ECFP-fusionierte Organellmarker. FLT-3 ITD alleine zeigte eine perinukleäre Verteilung, die sich hauptsächlich mit dem ER-Marker deckte und nur partiell mit dem GOLGI-Marker. Koexprimierte man hingegen SHP-1, so zeigte sich eine Umverteilung von FLT-3 ITD, hauptsächlich in die Zellperipherie inklusive der Plasmamembran (s. Abb. 3.6).

Um sicher zu gehen, dass die Überexpression aktiver Kinase oder Phosphatase nicht zu einer generellen Beeinflussung des Glykoproteinreifungssystems führte, untersuchten wir das Reifungsverhalten eines nicht-verwandten Glykoproteins unter gleichen Bedingungen. Dazu koexprimierten wir das Glykoprotein des *Vesicular Stomatitis-Virus* (VSV-G) entweder mit FLT-3 ITD, FLT-3 ITD KA oder SHP-1. Da sich die verschiedenen glykosylierten Formen von VSV-G nicht stark in der Größe unterscheiden, immunopräzipitierten wir VSV-G und bestimmten den Anteil der ER-residenten Fraktion mittels EndoH-Verdau. Die Glykosylierung von VSV-G wurde aber durch keines der koexprimierten Proteine beeinflusst (s. Abb. 3.7).

Wir konnten also beobachten, dass die Dephosphorylierung von FLT-3 ITD durch eine PTPase zu einer Verbesserung seiner Reifung führte.

Um zu untersuchen, ob der SHP-1 Effekt spezifisch für diese Phosphatase ist, koexprimierten wir andere PTPasen zusammen mit FLT-3 ITD transient in HEK293 Zellen. Bei allen drei getesteten Phosphatasen ließ sich eine eindeutige Korrelation

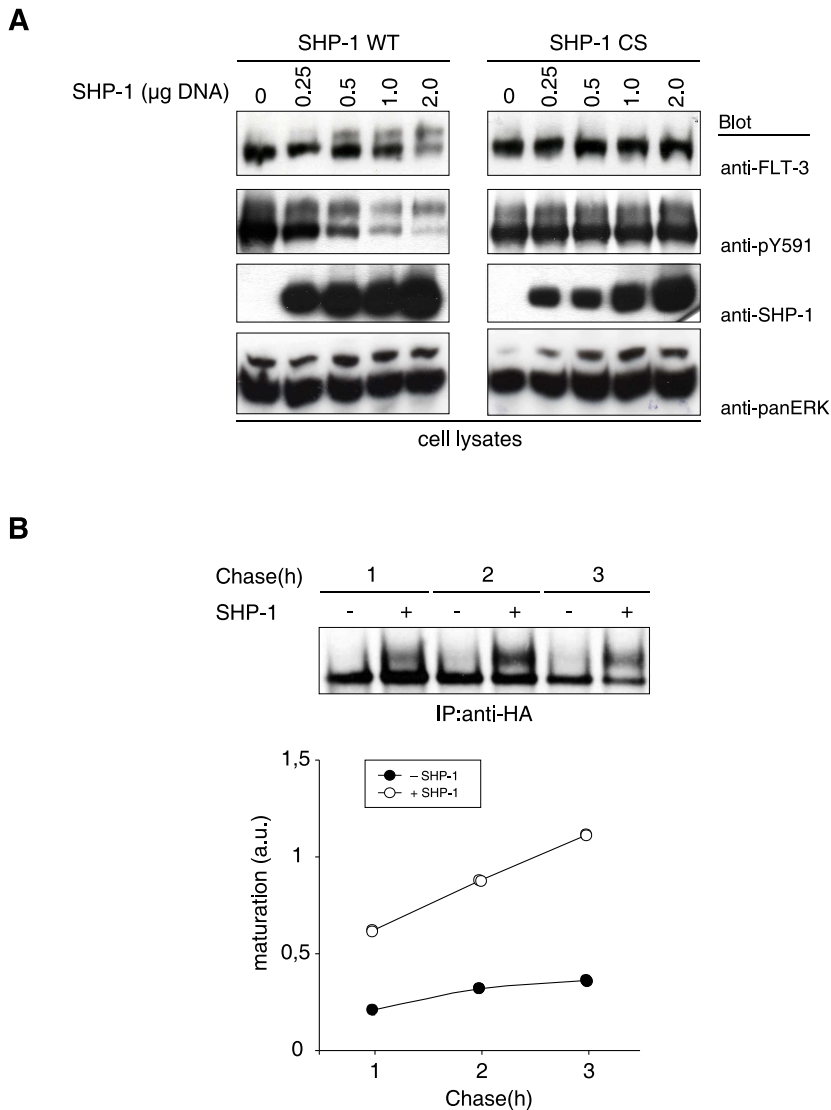


Abbildung 3.5: **SHP-1 dephosphoryliert FLT-3 ITD und begünstigt seine Reifung.** **A:** FLT-3 ITD wurde mit unterschiedlichen Mengen an SHP-1 oder katalytischer SHP-1 CS-Mutante koexprimiert. Die Expression und Tyrosinphosphorylierung von FLT-3 und die Expression von SHP-1 wurden im Immunoblot von Lysat-Aliquoten analysiert. **B:** HA-getagtes FLT-3 ITD wurde alleine oder zusammen mit SHP-1 in COS-7 Zellen exprimiert. Die Zellen wurden für 20 min. metabolisch mit [ $^{35}$ S]Methionin/[ $^{35}$ S]Cystein markiert und die Reifung von FLT-3 wie unter 3.3 D angegeben, analysiert.



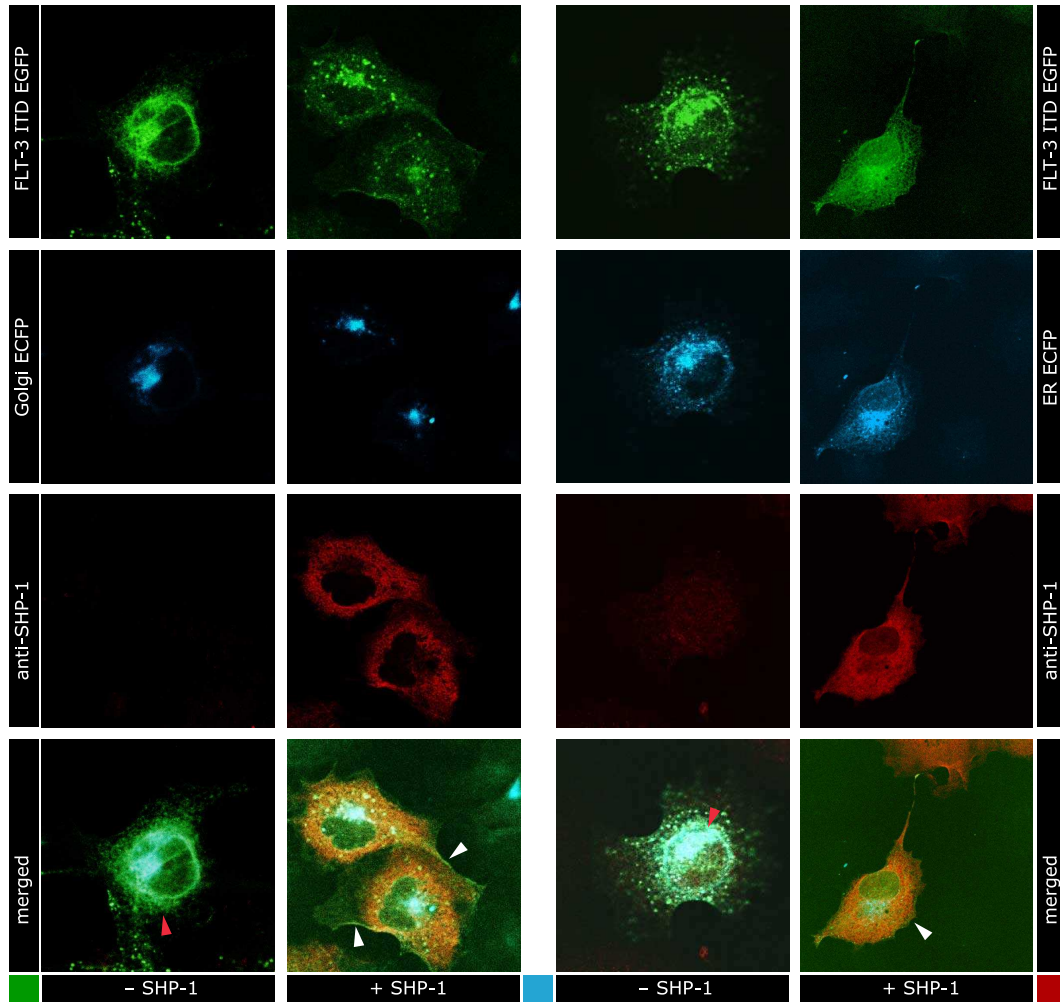


Abbildung 3.6: **Expression von SHP-1 induziert Plasmamembranlokalisierung von FLT-3 ITD.** EGFP-getagtes FLT-3 ITD wurde alleine oder in der Gegenwart von SHP-1 mit ECFP-getagtem ER-Marker oder ECFP-getagtem GOLGI-Marker transfiziert. Die Expression von SHP-1 wurde mittels Immunzytochemie mit anti-SHP-1 und Cy3-gefärbtem sekundärem Antikörper nachgewiesen. Die Expression der markierten Proteine wurde durch EGFP- oder ECFP-Fluoreszenz analysiert. Die Bilder wurden an einem Laser-Scanning Mikroskop aufgenommen. Weiße Pfeile zeigen eine Membranlokalisierung, rote eine perinukleäre Lokalisation an.



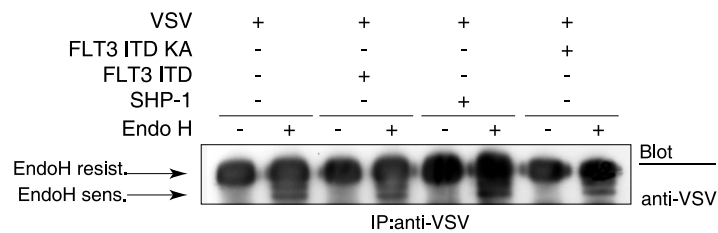


Abbildung 3.7: **Überexpression von FLT-3 ITD oder SHP-1 führen nicht zu einer generellen Beeinflussung des Glykoproteinreifungssystems.** VSV Glykoprotein (VSV) wurde in HEK293 Zellen entweder alleine oder mit einem der Proteine FLT-3 ITD, FLT-3 ITD K644A, SHP-1 koexprimiert. VSV Glykoprotein wurde immunopräzipitiert und mit EndoH verdaut oder scheinbehandelt und im Immunoblot analysiert. ER-ständiges VSV Glykoprotein ist durch das Auftreten einer niedermolekularen Bande nach EndoH-Verdau gekennzeichnet. Reifes VSV Glykoprotein ist EndoH-resistent.

zwischen Dephosphorylierung und reifungsförderndem Effekt beobachten. Während RPTP $\alpha$  keinerlei Effekt hatte, zeigte PTP-PEST einen schwachen und PTP1B ein sehr starken Effekt auf Phosphorylierung und Reifung von FLT-3 ITD (s. Abb. 3.8).

Bisher beschränkten sich unsere Experimente mit PTPasen auf die Untersuchung der Effekte ihrer Überexpression auf die ineffiziente Reifung von FLT-3 ITD. Wir wollten in weiteren Experimenten prüfen, ob endogene PTPasen eine Rolle für die normale Reifung von FLT-3 Wildtyp spielen. In einem ersten Ansatz hemmten wir endogene PTPasen in THP-1 Zellen mit dem irreversiblen Inhibitor bp(V)phen über verschiedene Zeiträume. Wir beobachteten, dass FLT-3 WT bereits nach einer Stunde Hemmung in der 130 kDa Form akkumulierte und bei weiterer Hemmung abgebaut wurde (s. Abb. 3.9 A). Gleichzeitige Hemmung des Proteasoms mit MG132 konnte zwar den Abbau verhindern, nicht jedoch die Akkumulation in der unrei-

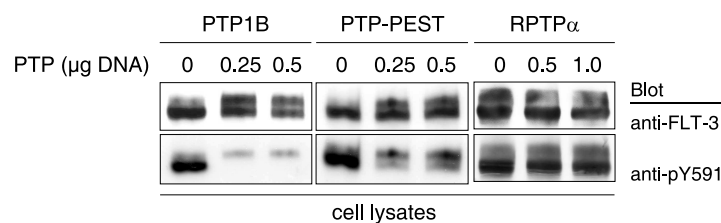


Abbildung 3.8: **PTP1B ist potente PTPase für FLT-3.** FLT-3 ITD wurde koexprimiert mit unterschiedlichen Mengen an PTP1B, PTP-PEST oder RPTP $\alpha$  in HEK293 Zellen. Lysat-Aliquote wurden im Immunoblot analysiert.

fen Form (s. Anhang E). Um spezifisch die Rolle einzelner PTPasen bei der Reifung von FLT-3 WT herauszuarbeiten, wählten wir einen siRNA- Depletionsansatz. Wir exprimierten FLT-3 WT in HEK293 Zellen und unterdrückten die Expression von endogener PTP1B durch die Koexpression eines PTP1B siRNA Expressionskonstrukts. Obwohl PTP1B nicht komplett depletiert war, konnte man ein starker Anstieg in der Tyrosinphosphorylierung von FLT-3 WT beobachtet werden, was in einer Akkumulation der 130 kDa Bande resultierte (s. Abb. 3.9 B). Der Versuch, PTP1B mit synthetischen siRNAs in THP-1 Zellen zu supprimieren, führte lediglich zu einer 35 %-igen Depletion. Die Depletion von SHP-1 mit der gleichen Herangehensweise führte zu einer 80 %-igen Reduktion der endogenen SHP-1 Expression. Nichtsdestotrotz zeigte die PTP1B Depletion einen reifungshemmenden Effekt auf FLT-3 WT, während die Depletion von SHP-1 nur eine schwache Auswirkung hatte (s. Abb. 3.9 C).

Wir konnten also beobachten, dass Proteintyrosinphosphatasen nicht nur die Reifung von FLT-3 ITD begünstigen können, sondern eine wichtige Rolle bei der Reifung von FLT-3 WT spielen. Interessanterweise korrelierte der Effekt auf die Reifung mit der intrazellulären Lokalisation der PTPase. Die PTPasen SHP-1 und PTP1B, die perinukleär, bzw. am ER lokalisiert sind, zeigten auch den stärksten Effekt auf die Reifung von FLT-3.

### **3.3 Tyrosinphosphorylierung als allgemeiner Regulator bei der Reifung von Rezeptortyrosinkinasen**

Es stellte sich nun die Frage, ob die Regulation der Reifung durch Tyrosinphosphorylierung ein FLT-3 spezifischer Mechanismus, oder ein allgemein gültiges Prinzip für Rezeptortyrosinkinasen ist. Um diese Frage zumindest im Ansatz zu beantworten, untersuchten wir das Reifungsverhalten anderer Rezeptortyrosinkinasen mittels Immunoblotting. Überexprimierten wir den FLT-3 homologen PDGF $\beta$  Rezeptor in HEK293 Zellen, so zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung zwischen unreifer und reifer Form. Exprimierten wir hingegen die kinaseinaktive K634A Mutante des

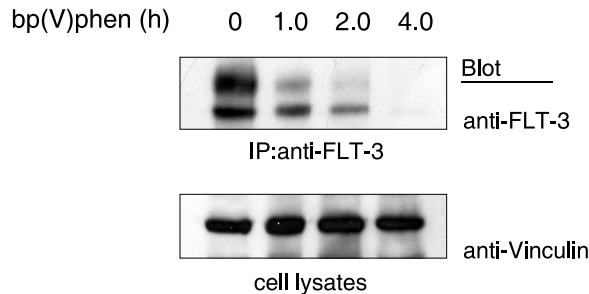
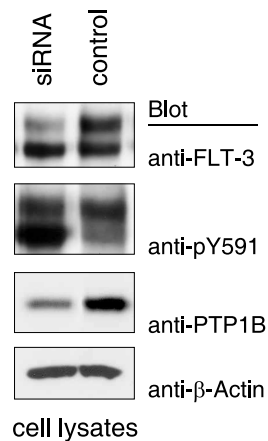
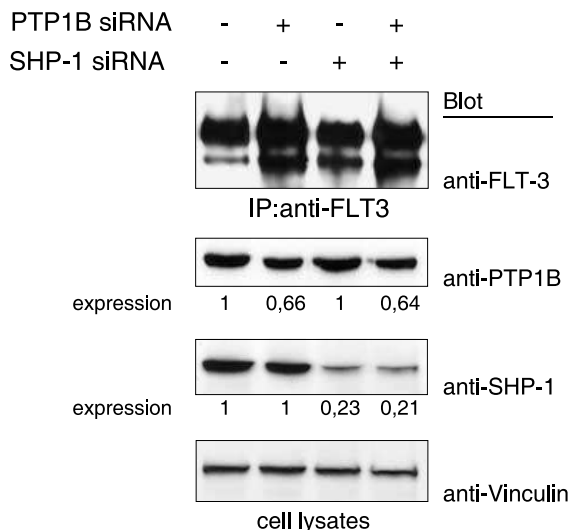
**A****B****C**

Abbildung 3.9: **Hemmung oder Depletion endogener PTPasen führt zur ER-Retention von FLT-3 WT.** **A:** THP-1 Zellen wurden mit dem Breitband-Phosphataseinhibitor bp(V)phen für die angegebene Zeitdauer inkubiert, FLT-3 aus Zelllysaten immunopräzipitiert und die Expression im Immunoblot analysiert. **B:** HEK293 Zellen wurden mit FLT-3 WT transfiziert und entweder mit dem Expressionskonstrukt pSUPER PTP1B shRNA oder dem leeren pSUPER.retro.puro Vektor transfiziert. Lysat-Aliquote wurden im Immunoblot analysiert. **C:** THP-1 Zellen wurden stabil mit leerem pSUPER.retro.puro oder mit dem Expressionskonstrukt pSUPER SHP-1 shRNA transfiziert. Stabile Transfektanten wurden mit PTP1B oder Kontroll siRNA mittels Amaxa Elektroporation transfiziert. FLT-3 wurde immunopräzipitiert und die Expression im Immunoblot untersucht. Zur Kontrolle der Expressions von SHP-1 und PTP1B wurden Lysat-Aliquote im Immunoblot analysiert und densitometrisch ausgewertet. Relative Expressionsspiegel sind unter den Blots angegeben.

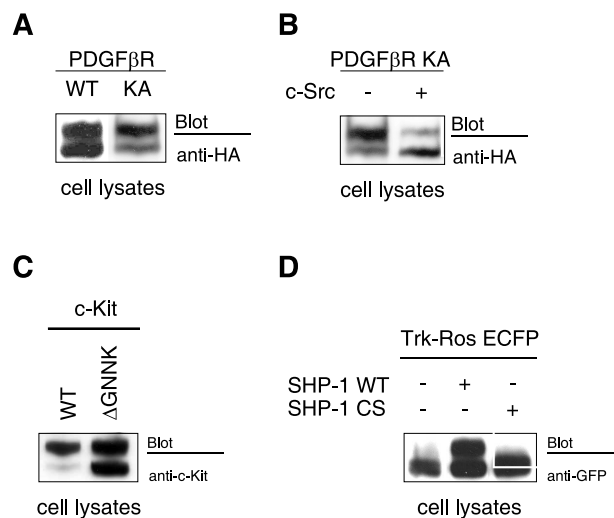


Abbildung 3.10: **Die Reifung anderer RTKs ist auch phosphotryrosinabhängig.** Folgende Proteine wurden in HEK293 Zellen exprimiert: **A.** PDGFβ Rezeptor oder die kinaseinaktive KA Mutante. **B.** Die kinaseinaktive PDGFβR KA Mutante, alleine oder mit c-Src. **C.** c-Kit oder die hyperaktive c-Kit<sup>ΔGNNK</sup> Variante. **D.** die Chimäre Trk-Ros, die aus der Extrazellulärdomäne von humanem TrkA und der zytoplasmatischen Domäne von murinem c-Ros besteht; entweder alleine oder mit SHP-1 oder der katalytisch inaktiven CS-Mutante von SHP-1.

PDGFβ Rezeptors, so reifte dieser wesentlich besser und es war überwiegend die reife Form zu detektieren (s.Abb. 3.10 A). Koexprimierten wir die zytoplasmatische Kinase c-Src mit der K634A Mutante des PDGFβ Rezeptors, so war zu beobachten, dass c-Src den Rezeptor heterolog phosphorylieren konnte und dadurch die PDGFβR-Reifung hemmte, was sich im Immunoblot durch eine Akkumulation der unreifen Form beobachten ließ (s.Abb. 3.10 B).

Von der FLT-3 homologen Rezeptortyrosinkinase c-Kit sind zwei verschiedene Spleißvarianten bekannt: c-Kit WT und c-Kit<sup>ΔGNNK</sup>. Letztere zeichnet sich durch eine Deletion im membrannahen Bereich der Extrazellulärdomäne aus, was sich in einer konstitutiven Aktivierung äußert, vermutlich, weil die zytoplasmatischen Domänen so gegeneinander rotiert sind, dass sie einem aktivierten Zustand ähneln. Wurden beide Varianten in HEK293 Zellen exprimiert, so zeigte sich, dass das hyperaktive c-Kit<sup>ΔGNNK</sup> wesentlich schlechter reifte als der "Wildtyp" und in der Hochmannoseform akkumulierte (s.Abb. 3.10 C).

Wir untersuchten auch das Verhalten einer Rezeptortyrosinkinase aus einer an-

deren Familie, nämlich c-Ros. Da von c-Ros der Ligand nicht bekannt ist, exprimierten wir die Kinase als Chimäre zwischen der Extrazellulärdomäne von TrkA und der zytoplasmatischen Domäne von c-Ros. Wir exprimierten Trk-Ros alleine, mit SHP-1 oder der katalytisch inaktiven CS Mutante von SHP-1. Frühere Experimente in unserem Labor hatten SHP-1 als potente PTPase für c-Ros identifiziert. Überexpression von Trk-Ros führte zu einer nahezu vollständigen Akkumulation von Trk-Ros in der unreifen Hochmannoseform. Koexpression mit SHP-1 jedoch förderte immens die Reifung zur komplex glykosylierten Form. Dieser Effekt war nicht zu beobachten mit der katalytisch inaktiven CS-Mutante von SHP-1 (s.Abb. 3.10 D).

Wir konnten also die gleichen Effekte der Tyrosinphosphorylierung auf die Reifung anderer, auch strukturell nicht verwandter Rezeptortyrosinkinasen beobachten. Demnach scheint die Regulation der Reifung von Rezeptortyrosinkinasen durch Tyrosinphosphorylierung ein allgemeiner gültiges Prinzip zu sein.

### **3.4 Spezifische Signalwege spielen eher eine untergeordnete Rolle bei der ER-Retention von FLT-3 ITD.**

Wir waren nun am Mechanismus der phosphotyrosinabhängigen ER-Retention von FLT-3 ITD interessiert. Da sich in den vorangegangenen Experimenten gezeigt hatte, dass die unreife Hochmannoseform als Kinase aktiv ist, bestand also die Möglichkeit, dass FLT-3 ITD Signalwege vom endoplasmatischen Retikulum aus initiierte und dass möglicherweise einer dieser Signalwege verantwortlich für die ER-Retention war. Um dieser Frage nachzugehen, hemmten wir pharmakologisch ausgewählte Signalmoleküle, in mit FLT-3 ITD transient transfizierten HEK293 Zellen, und beobachteten die Auswirkungen auf das Reifungsverhalten von FLT-3 ITD. Die Hemmung von FLT-3 ITD durch AG1296 oder SU11248 zeigten den in Kapitel 3.2 beschriebenen reifungsfördernden Effekt. Die Hemmung von Phosphatidylinositol-3-kinasen (PI3-Kinasen) durch Wortmannin zeigte keinen Effekt auf die Reifung. Hemmte man jedoch die Familie der Src Kinasen mit PP1 oder die PKC-Familie

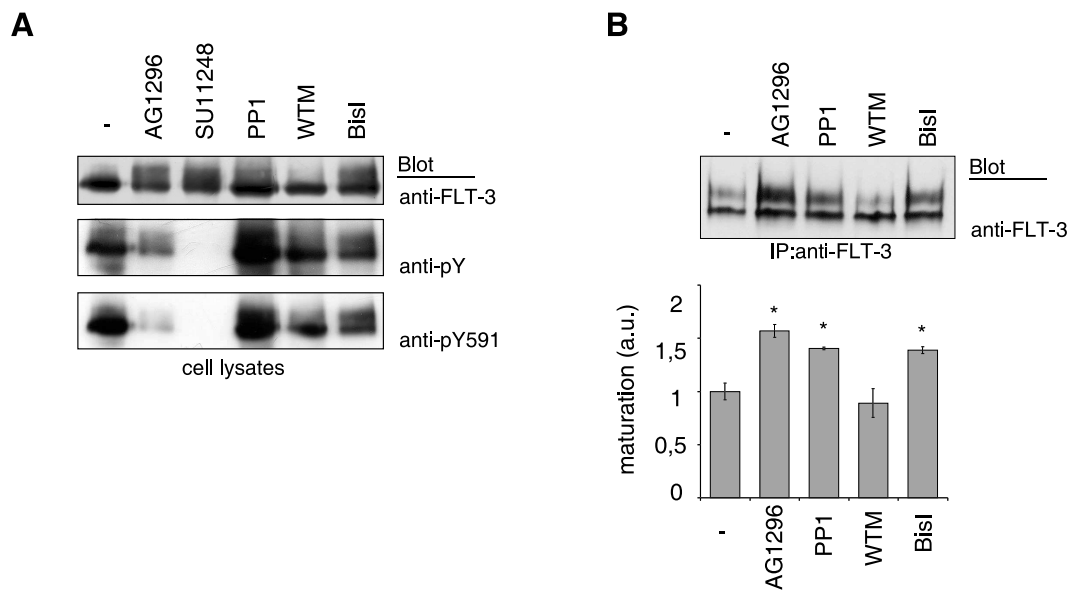


Abbildung 3.11: **Die Rolle von Signalwegen bei der ER-Retention von FLT-3 ITD.** FLT-3 ITD exprimierende COS-7 Zellen (**A**) oder MV4-11 Zellen (**B**) wurden entweder mit dem FLT-3 Tyrosinkinaseinhibitoren AG1296 oder SU11248, dem Src-Kinaseinhibitor PP1, dem PI3Kinaseinhibitor Wortmannin (WTM) oder dem PKC-Familieninhibitor Bis I für drei Stunden inkubiert und die Expression im Immunoblot von Lysat-Aliquoten (**A**) oder FLT-3 Immunopräzipitaten (**B**) analysiert. Die Ergebnisse von drei MV4-11 Zellexperimenten wurden densitometrisch ausgewertet und Reifung als Verhältnis aus 150 kDa zu 130 kDa-Form berechnet.

mittels Bisindolylmaleimid I (Bis I), so zeigte sich ein leichter reifungsfördernder Effekt. Dieser war jedoch nicht so ausgeprägt, wie bei einer direkten Hemmung von FLT-3 ITD (s.Abb. 3.11 A). Vorhergehende Experimente hatten ergeben, dass weder PP1 noch BisI FLT-3 direkt hemmen können (Daten nicht gezeigt). Der reifungsfördernde Effekt der PP1 und BisI Hemmung war in MV4-11 Zellen mit endogenem FLT-3 ITD reproduzierbar (s.Abb. 3.11 B).

Da die Hemmung mit PP1 die Reifung von FLT-3 ITD begünstigte, lag der Schluss nahe, dass Kinasen der Src Familie eine negative Rolle bei der Rezeptor-tyrosinkinaserreifung spielen und damit eine Überexpression von c-Src die Reifung von kinase-inaktivem FLT-3 ITD KA hemmen sollte. In der Tat war dies in transienten Koexpressionsexperimenten sowohl mit FLT-3 WT KA, als auch mit FLT-3 ITD KA beobachtbar (s.Abb. 3.12). Es läßt sich jedoch keine Aussage darüber treffen, ob das an einer selektiven Aktivierung eines Src-abhängigen Signalweges lag, oder

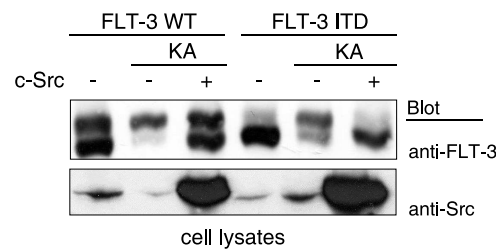


Abbildung 3.12: **Überexpression von c-Src hemmt die Reifung von FLT-3.** Die angegebenen FLT-3 Varianten wurden in HEK293 Zellen entweder allein exprimiert, oder zusammen mit c-Src. Lysat-Aliquote wurden im Immunoblot analysiert.

lediglich an der heterologen Phosphorylierung des Rezeptors.

In einem komplementären Ansatz mutierten wir einzelne Autophosphorylierungs-orte in FLT-3 zu Phenylalanin, um spezifisch stromabwärts aktivierte Signalwege auszuschalten und deren Rolle bei der Reifung zu untersuchen (s. Abb. 3.13). In Analogie zu den homologen Rezeptortyrosinkinasen PDGF $\beta$  Rezeptor und c-Kit sind Tyr589 und Tyr591 in FLT-3 potentielle Bindestellen für c-Src. Auch neuere Daten aus anderen Arbeitsgruppen deuten auf eine Rolle von Tyr589 und Tyr591 bei der Bindung von Kinasen der Src Familie hin (Heiss et al. [2006] und O.Mitina, pers.Kommunikation). Die Einzelmutanten Y589F und Y591F hatten keinen reifungsfördernden Effekt bei FLT-3 ITD, während Y591F Mutation zu einer leicht gesteigerten bei FLT-3 WT führte. Die Doppelmutante FLT-3 ITD Y589,591F zeigt jedoch ein leicht gesteigertes Reifungsverhalten bei FLT-3 ITD, was die potentielle Beteiligung von c-Src abhängigen Signalwegen unterstreicht. Außer der kompletten Kinaseinaktivierung durch die Lys644Ala Mutation, zeigte den stärksten reifungsfördernden Effekt eine Tyr842Phe Mutation, sowohl bei FLT-3 WT als auch bei FLT-3 ITD. Wie in Kapitel 1.2 erwähnt, ist die Phosphorylierung innerhalb der Aktivierungsschleife wichtig für die Kinaseaktivierung. Es zeigte sich dann auch in Phosphotyrosinblots, dass die Kinaseaktivität dieser Mutante stark reduziert war. Der reifungsfördernde Effekt dieser Mutante ist demnach eher, wie bei der K644A Mutante, auf eine Hemmung der globalen Phosphorylierung zurückzuführen, denn auf die Ausschaltung eines spezifischen Signalweges. Eine Tyr842Cys Mutation (Kindler et al. [2005]) hingegen führt zur konstitutiven Aktivierung von FLT-3, ver-

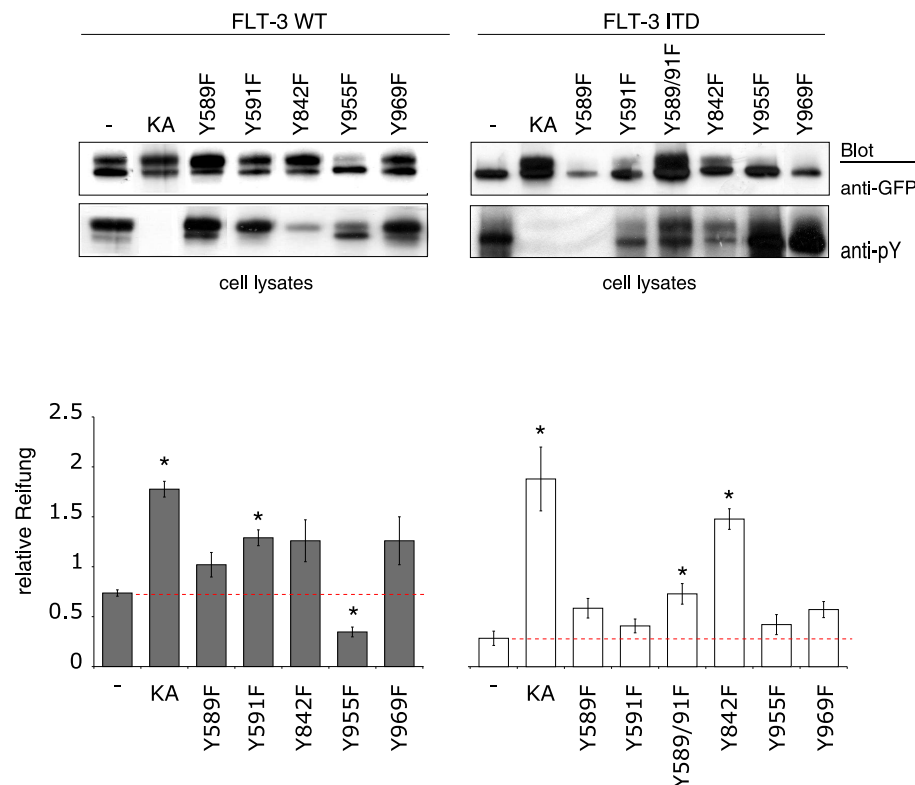


Abbildung 3.13: **Rolle individueller Autophosphorylierungsorte bei der Reifung von FLT-3.** Die angegebenen Muntanten von EGFP-getagtem FLT-3 WT oder FLT-3 ITD wurden in COS-7 Zellen exprimiert. Expression und Phosphorylierung wurden im Lysat-Immunoblot analysiert. Die Ergebnisse aus drei, bzw. vier Experimenten wurden mittels Densitometrie quantifiziert und Reifung wurde als Verhältnis zwischen 150 kDa und 130 kDa-Form errechnet. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  s.e.m. Sternchen zeigen eine P-Wert  $< 0.05$  an.

mutlich weil das Cystein keine H-Brücke mehr zu Arg834 ausbilden kann und so eine aktive Konformation der Aktivierungsschleife begünstigt wird. FLT-3 Y842C zeigte ebenfalls ein geringfügig eingeschränktes Reifungsverhalten (s. Abb. 3.14). Einzelmutationen der Tyrosine 955, bzw. 969 hatten keinerlei reifungsfördernden Effekt bei FLT-3 WT und ITD. Interessanterweise zeigte die Tyr955Phe Mutante bei FLT-3 WT einen genau gegenteiligen Effekt, nämlich eine Akkumulation der unreifen Hochmannoseform. Die Kinase war jedoch genauso aktiv wie der Wildtyp. Zu diesem Zeitpunkt ist nach wie vor unklar, welche Signalwege durch die Phosphorylierung von Tyr955 angeschaltet werden. Studien zum EGF Rezeptor und zum PDGF $\beta$  Rezeptor hatten gezeigt, dass der C-Terminus dieser Kinasen eine Rolle bei



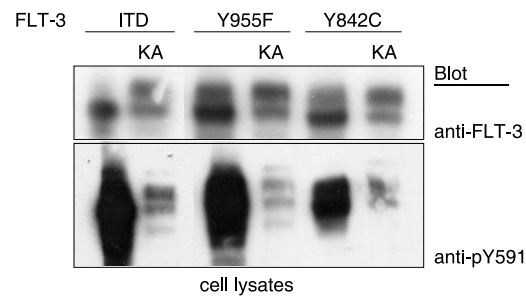


Abbildung 3.14: **K644A Mutation ist dominant gegenüber retardierenden Punktmutanten.** Die angegebene Mutanten von EGFP-getagtem FLT-3 WT wurden in HEK293 Zellen exprimiert und Lysat-Aliquote auf Expression und Phosphorylierung von FLT-3 mittels Immunoblot untersucht.

der Autoregulation spielt. Da zu FLT-3 diesbezüglich keinerlei Experimente vorliegen und der C-Terminus auch nicht mit in der Kristallstruktur aufgelöst war, ist also die Rolle des FLT-3 C-Terminus vollkommen unklar. Es ist aber denkbar, dass die Tyr955Phe Mutation eine aktive Konformation der Kinase begünstigt und es deswegen zur ER-Retention kommt. Diese Argumentation wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die kinaseinaktivierende Mutation K644A den ER-retardierenden Effekt von Y955F rückgängig machen kann (s.Abb. 3.14).

Der reifungshemmende Effekt der Tyrosinphosphorylierung ist nur partiell mit der Beteiligung von c-Src abhängigen Signalwegen und einer potentiellen autoregulatorischen Funktion des C-Terminus zu erklären. Hauptregulator aber scheint die globale Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors zu sein.

### 3.5 Strukturelle Parameter und HSP90-Abhängigkeit

Eine mögliche Erklärung für die oben beschriebenen Beobachtungen ist, dass eine hyperaktive Kinase sich nicht ausreichend effizient falten kann. Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, bindet HSP90 an nahezu nativ gefaltete Kinasen. Diese Assoziation ist von verschiedenen weiteren Faktoren abhängig. Um zu untersuchen, ob FLT-3 ITD in einem missgefalteten, HSP90-abhängigen Zustand vorliegt, behandelten wir transient transfizierte HEK293 Zellen für sechs Stunden mit dem HSP90-Hemmstoff Geldanamycin. Während die Expression von FLT-3 WT leicht reduziert war, konn-

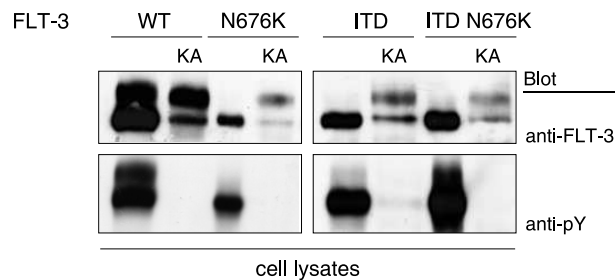


Abbildung 3.15: **Punktmutationen in der  $\alpha C\beta 4$ -Schleife führen zur ER-Retention.** Die angegebenen Mutanten von HA-getagtem FLT-3 WT bzw. FLT-3 ITD wurden in HEK293 Zellen exprimiert. Expression und Phosphorylierung von FLT-3 wurde im Immunoblot von Lysat-Aliquoten untersucht.

te man FLT-3 ITD im Immunoblot nicht mehr detektieren (Schmidt-Arras et al. [2005]), was sich mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen deckte. Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, spielt, zumindest bei Mitgliedern der EGF Rezeptorfamilie, die  $\alpha C\beta 4$ -Schleife im N-terminalen Kinaselappen eine wichtige Rolle bei der Bindung von HSP90. Wir waren daher interessiert, ob dieses Strukturelement auch bei FLT-3 eine HSP90-Sensitivität vermittelt. Heidel et al. [2006] hatten kürzlichst eine PKC412-resistente N676K Punktmutante von FLT-3 ITD entdeckt. Die Mutation liegt innerhalb der  $\alpha C\beta 4$ -Schleife. Mittels in-vitro Mutagenese führten wir die N676K Mutation sowohl bei FLT-3 WT und FLT-3 WT KA, als auch bei FLT-3 ITD und FLT-3 ITD KA ein, exprimierten die Mutanten in HEK293 Zellen und analysierten das Reifungsverhalten im Immunoblot (s.Abb. 3.15).

Interessanterweise zeigte sich, dass FLT-3 N676K unvollständig reifte und nur in der unreifen Hochmannoseform detektierbar war. FLT-3 K644A N676K hingegen zeigte das gleiche effiziente Reifungsverhalten wie FLT-3 K644A. Eine eingehendere Analyse der FLT-3 Kristallstruktur zeigte, dass Asn676 eingebettet ist in ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken, die die  $\alpha C\beta 4$ -Schleife in einer rigiden Struktur stabilisieren (s.Abb. 3.16 B). Wir beobachteten auch, dass sich das Oberflächenpotential der  $\alpha C\beta 4$ -Schleife nach Mutation verändert (s.Abb. 3.16 C). Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, hatten Xu et al. [2005] eine Oberflächenpotentialänderung in diesem Bereich bei ErbB2 für seine Geldanamycin-Sensitivität verantwortlich gemacht. Wir waren daher interessiert zu klären, ob FLT-3 N676K eine

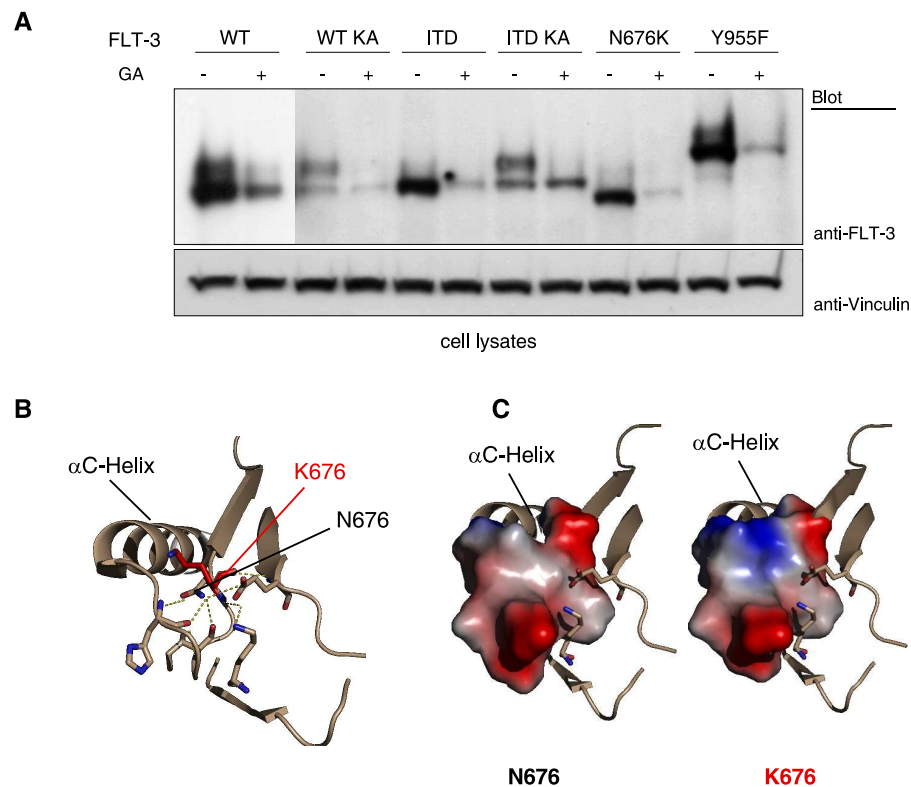


Abbildung 3.16: **Die Proteininstabilität ER-retardierter FLT-3 Mutanten ist HSP90-abhängig.**

**A:** Die angegebenen HA-(WT, ITD, WT KA, ITD KA), EGFP-(FLT-3 Y955F) oder ungetagten (N676K) FLT-3 Varianten wurden in HEK293 Zellen exprimiert. 24h nach Transfektion wurden die Zellen mit 3  $\mu$ M Geldanamycin für 6 h behandelt und anschließend lysiert. Expression von FLT-3 wurde im Immunoblot untersucht. **B:** Kristallstruktur der  $\alpha$ C $\beta$ 4-Schleife. H-Brücken innerhalb der Schleife wurden mit PyMol ermittelt und in gelb dargestellt. Mit Hilfe des Mutagenese-Werkzeug von PyMol wurde Asn676 durch Lys ersetzt und in rot dargestellt. **C:** Mit Hilfe von PyMol wurde das elektrostatische Oberflächenpotential der  $\alpha$ C $\beta$ 4- Schleife in WT (N676) oder Mutante (K676) ermittelt. Rot stellt negatives, blau positives Potential dar.

erhöhte HSP90-Abhängigkeit aufwies. Dazu transfizierten wir FLT-3 N676K und andere ER-retardierte FLT-3 Mutanten in HEK293 Zellen und behandelten diese mit Geldanamycin (s.Abb. 3.16 A). Wie erwartet waren FLT-3 ITD und FLT-3 N676K, aber interessanterweise auch FLT-3 Y955F Geldanamycin sensitiv. FLT-3 WT zeigte in diesem Experiment ebenfalls eine hohe Geldanamycin-Sensitivität. Dieser Effekt war vermutlich auf die starke Überexpression zurückzuführen, die zu spontaner Dimerisierung, Phosphorylierung und wie zu sehen, auch partieller ER-Retardierung führte. Es bedarf daher weiterer Experimente, auch mit stabil trans-

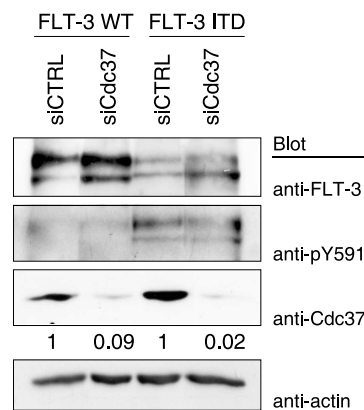


Abbildung 3.17: **Depletion von Cdc37 reicht nicht aus, um FLT-3 ITD aus der ER-Retention zu lösen.** Mit FLT-3 WT oder ITD stabil transfigierte HEK293 Zellen wurden mit siRNA-Oligos transfigiert und für 48 h inkubiert. Expression von FLT-3 und Cdc37 wurde im Immunoblot von Lysataliquoten analysiert. Relative Expressionsspiegel von Cdc37 wurden densitometrisch ermittelt und unterhalb des Blots angegeben.

fizierten Zellen, um zu untersuchen, ob die Punktmutanten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Geldanamycin besitzen als FLT-3 WT. Bei den kinaseinaktiven FLT-3 WT K644A und FLT-3 ITD K644A war zwar die reife, komplex glykosylierte Form noch Geldanamycin-sensitiv, die unreife Hochmannoseform hingegen war resistent. Dieser Effekt war nicht abhängig von Lys644, sondern von einem gehemmten Phosphotransfer, da eine FLT-3 ITD D811N Mutante genau das gleiche Verhalten zeigte (Daten nicht gezeigt).

Wie in Kapitel 1.4 besprochen, wird diskutiert, ob Cdc37 die Rekrutierung von HSP90 an Kinasen bewerkstelligt. Um eine Beteiligung von Cdc37 an der Retention und Kinaseaktivität von FLT-3 ITD zu untersuchen, depletierten wir Cdc37 mittels synthetischer RNA-Oligonukleotide in mit FLT-3 ITD oder WT stabil transfigierten HEK293 Zellen. Im Immunoblot war keinerlei Auswirkung auf das Reifungsverhalten von FLT-3 ITD zu beobachten. Auch die Kinaseaktivität war nicht beeinträchtigt (s. Abb. 3.17). Bei FLT-3 WT war in den Cdc37-depletierten Zellen lediglich ein geringfügiger Anstieg der Hochmannoseform zu beobachten.

Alle drei Mutationen ITD, N676K und Y955F haben vermutlich gemeinsam, dass sie eine aktive Konformation begünstigen. Als Folge davon sind alle drei HSP90-

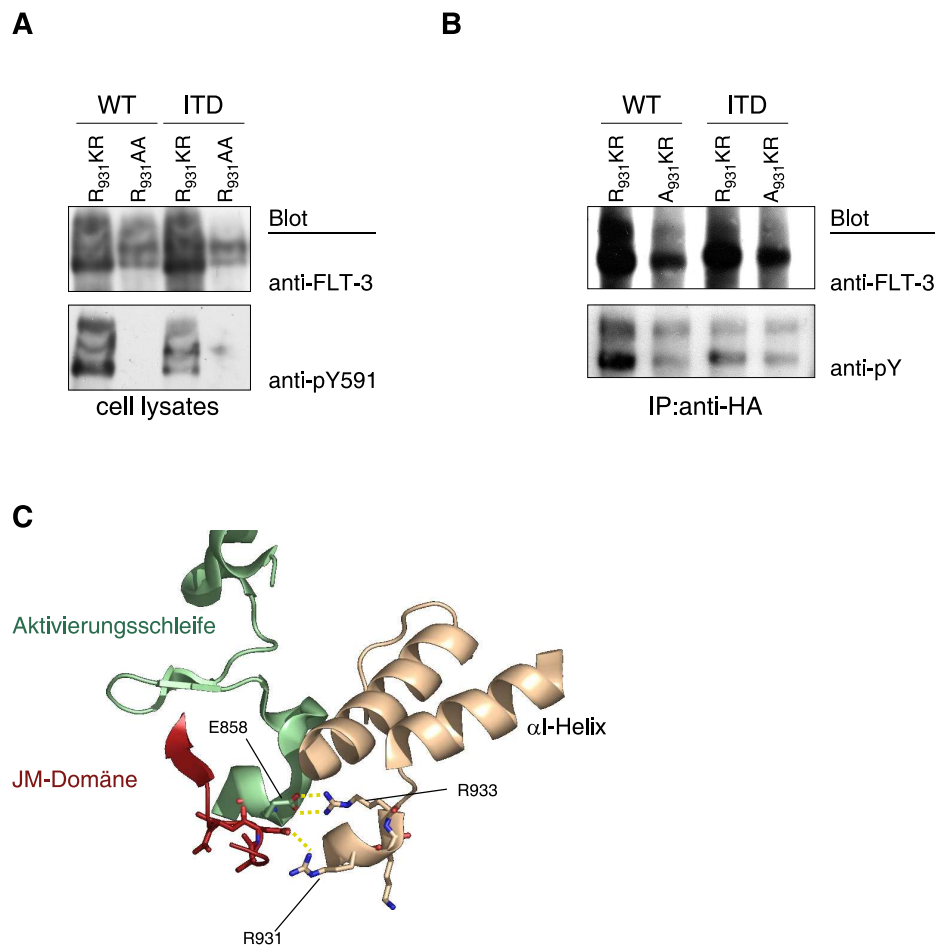


Abbildung 3.18: **Rolle eines potentiellen internen RXR-Motivs.** Die angegebenen Mutanten von HA-getagtem FLT-3, bzw. FLT-3 ITD wurden in HEK293 Zellen exprimiert. Die Zellen wurden lysiert und FLT-3 Expression und Phosphorylierung wurde im Immunoblot untersucht.

abhängig und retardieren im endoplasmatischen Retikulum, wobei HSP90 offensichtlich nicht das retardierende Prinzip ist.

ER-residente Transmembranproteine, aber auch Ionenkanäle verwenden RXR-basierte Sequenzmotive zur Retention im ER (Michelsen et al. [2005]). Nach einer Idee von Hauke Cornils (Diplomand in unserer Arbeitsgruppe), wollten wir untersuchen, ob eine C-terminale RXR-Sequenz (R<sub>931</sub> KR) in FLT-3 als internes ER-Retentionssignal fungiert. Nähere Untersuchungen der FLT-3 Kristallstruktur zeigten, dass Arg931 Wechselwirkungen mit der Juxtamembrandomäne zeigt (s. Abb. 3.18 C). Es bestand also die Möglichkeit, dass im inaktiven FLT-3 WT dieses Motiv

maskiert war, nicht jedoch in FLT-3 ITD mit aktiver Konformation. Wir erzeugten zwei verschiedene Mutanten von FLT-3 und FLT-3 ITD. Wir mutierten R<sub>931</sub>KR zu R<sub>931</sub>AA, bzw. zu A<sub>931</sub>KR. Letztere Mutation zeigte keinerlei Auswirkung auf Reifung oder Aktivität von FLT-3 ITD (s. Abb. 3.18 B). FLT-3 ITD K932A R933A hingegen zeigte ein verbessertes Reifungsverhalten (Abb. 3.18 A). Es zeigte sich jedoch, dass die Kinasefunktion inaktiviert war. Erneute Analyse der FLT-3 Struktur und Vergleiche mit PKA-Mutanten in der Literatur (Gibbs and Zoller [1991]) ergab, dass Arg933 invariant in Proteinkinasen ist und ionische Wechselwirkungen mit Glu858 der Aktivierungsschleife macht. Das C-terminale RKR in FLT-3 funktioniert offensichtlich nicht als internes ER-Retentionssignal. Die FLT-3 ITD R933A Mutation zeigte erneut, dass die Reifung von FLT-3 invers mit der Kinaseaktivität korrelierte.

### 3.6 ER Qualitätskontrolle und ER Lokalisation von FLT-3 ITD

#### FLT-3 ITD assoziiert mit Calnexin

Im Weiteren untersuchten wir, durch welchen molekularen Mechanismus FLT-3 ITD im ER retardiert wird. Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, spielt der Calnexin-Zyklus eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle der Faltung von Glykoproteinen. Fehlgefaltete Transmembran-Glykoproteine können durch Calnexin verlängert in der Qualitätskontrolle gehalten werden. Wie die vorangegangenen Experimente gezeigt hatten, weist FLT-3 ITD Faltungsdefizite auf. In der Tat konnten wir sowohl in hämatopoetischen Zelllinien, als auch in transient transfizierten HEK293 Zellen nachweisen, dass FLT-3 ITD eine erhöhte Assoziation mit Calnexin aufwies (s. Abb. 3.19 A). Interessanterweise war diese Assoziation abhängig von der Kinaseaktivität, da eine FLT-3 ITD K644A Mutante keine Assoziation mit Calnexin zeigte (s. Abb. 3.19 B).

Pulldowns mit aufgereinigtem GST-Calnexin Fusionsprotein aus MV4-11 Lysaten zeigten, dass Calnexin spezifisch nur mit der Hochmannoseform von FLT-3 ITD assoziiert. Im gleichen Experiment war auch zu beobachten, dass eine lektinde-

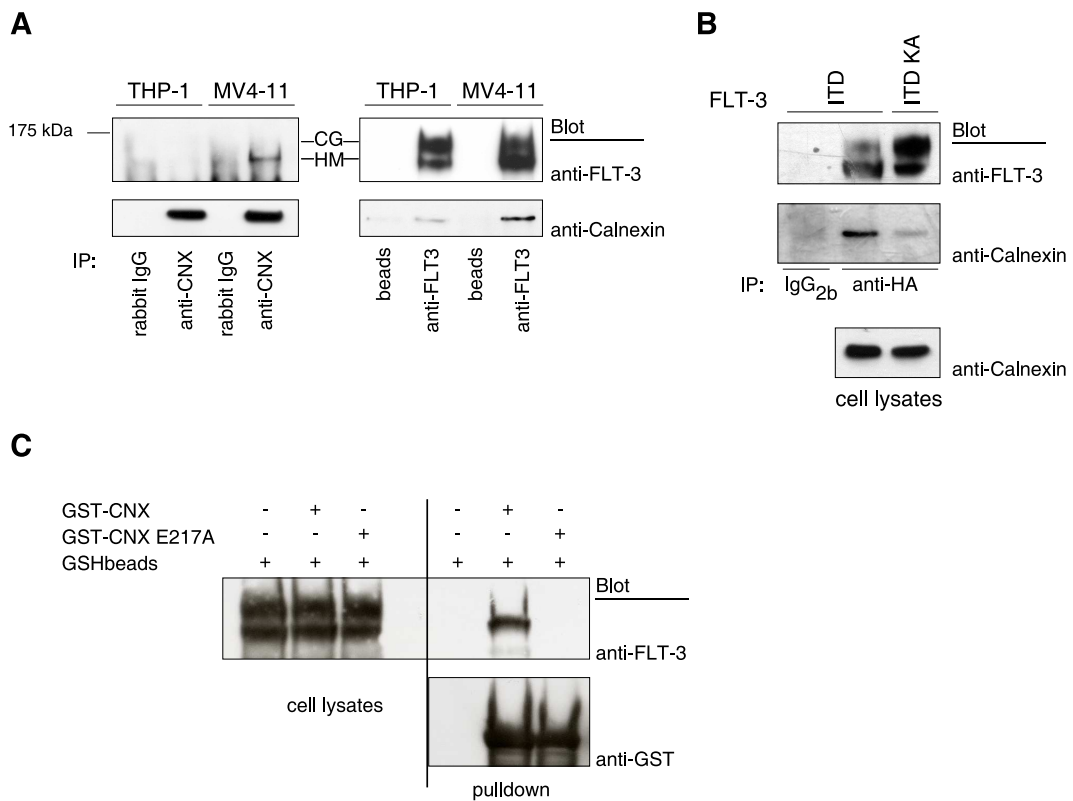


Abbildung 3.19: **FLT-3 ITD assoziiert mit Calnexin.** **A:** FLT-3 bzw. Calnexin wurden aus Lysaten von THP-1 oder MV4-11 Zellen immunopräzipitiert. Im Immunoblot wurde auf assoziiertes Calnexin bzw. FLT-3 untersucht. CM, komplex glykosylierte Spezies; HM: Hochmannoseform. **B:** HA-getagtes FLT-3 ITD, bzw. kinaseinaktives ITD K644A wurde in COS-7 Zellen exprimiert. FLT-3 wurde immunopräzipitiert und auf assoziiertes Calnexin im Immunoblot untersucht. **C:** GST-Fusionsproteine von Calnexin wurden mit MV4-11 Lysat inkubiert, mit GSH-beads präzipitiert und assoziiertes FLT-3 im Immunoblot analysiert. Die Expression von FLT-3 wurde im Immunoblot von Lysat-Aliquoten kontrolliert.

fiziente Glu217Ala Mutante von Calnexin nicht mehr in der Lage war, FLT-3 ITD zu präzipitieren (s. Abb. 3.19 C). Koexpressionsversuche von Calnexin Deletionsmutanten mit FLT-3 ITD in HEK293 Zellen wiesen leider keine zufriedenstellende Ergebnisse auf.

Die Assoziation der Hochmannoseform von FLT-3 ITD wird also über die Lektindomäne von Calnexin vermittelt und scheint lediglich von der Glukosylierung der Extrazellulärdomäne von FLT-3 ITD abhängig zu sein. Nichtsdestotrotz wird die Bindung durch die Kinaseaktivität von FLT-3 reguliert, wie die Experimente mit

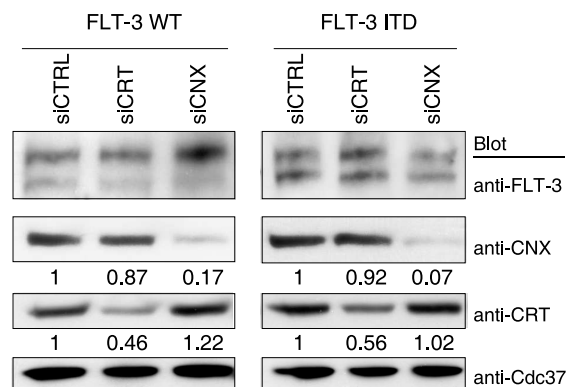


Abbildung 3.20: **Depletion von CNX oder CRT reicht nicht aus, um FLT-3 ITD aus der ER-Retention zu lösen.** Mit FLT-3 WT bzw. ITD stabil transfizierte HEK293 Zellen wurden mit siRNA-Oligos gegen Calnexin oder Calreticulin transfiziert und für 48 h inkubiert. Die Expression von Calnexin, Calreticulin und FLT-3 wurde im Immunoblot von Lysat-Aliquoten analysiert und densitometrisch ausgewertet. Die relativen Expressionsspiegel sind unter dem Blot angegeben.

FLT-3 ITD KA zeigen.

### Calnexin ist nicht das alleinige retardierende Prinzip

Die Assoziation von FLT-3 ITD mit Calnexin eröffnete natürlich die Frage, ob Calnexin hauptverantwortlich für die Retention von FLT-3 ITD ist. Um dieser Frage nachzugehen, depletierten wir Calnexin oder Calreticulin mit synthetischen RNA-Oligos in mit FLT-3 WT oder ITD stabil transfizierten Zellen (s. Abb. 3.20). Obwohl die Calnexin-Expression um über 80 % und die von Calreticulin um über 50 % reduziert war, zeigte sich kein Effekt auf das Reifungsverhalten von FLT-3 WT oder FLT-3 ITD. Die Abwesenheit eines der beiden Komponenten der ER-Qualitätskontrolle reicht offenbar nicht aus, um die ER-Retention von FLT-3 ITD zu überwinden.

### Eintritt in den Calnexin-Zyklus erhöht die Kinaseaktivität von FLT-3 ITD.

Da FLT-3 ITD trotz Calnexin- oder Calreticulin-Depletion in endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten wird, dachten wir über alternative Methoden nach, um die Notwendigkeit der in Kapitel 1.4 beschriebenen ER-Qualitätskontrolle für die ER-Retention von FLT-3 ITD zu untersuchen. Die in Kapitel 1.4 beschriebenen Glukosidase-Inhibitoren verhindern die Deglukosylierung der Hochmannose-Gly-



kanstruktur. Die so dreifach glukosylierten Glykoproteine können von Calnexin oder Calreticulin nicht mehr gebunden werden und so auch nicht in den Calnexin-Zyklus eintreten. Wir behandelten deshalb murine 32D Zellen, die mit FLT-3 ITD stabil transfiziert waren, mit unterschiedlichen Konzentrationen von Castanospermin und analysierten Immunpräzipitate von FLT-3 im Immunoblot (s.Abb. 3.21 A). Wir mußten feststellen, dass, wie eigentlich erwartet, ein verändertes Reifungs- bzw. Traffickingverhalten von FLT-3 ITD nicht im Immunoblot detektierbar war, da dreifach glukosylierte Glykoproteine im GOLGI nicht weiter prozessiert werden. Zu unserer Überraschung stellten wir aber fest, dass bei 500  $\mu$ M Castanospermin die Autosphosphorylierung von FLT-3 ITD stark reduziert war. Um auszuschließen, dass Castanospermin oder Deoxynojirimycin, ein weiterer Glukosidase-Inhibitor, FLT-3 Kinase direkt hemmen können, testeten wir die beiden Hemmstoffe in einem in-vitro Kinaseassay mit immunopräzipitiertem FLT-3 WT oder ITD (s.Abb. 3.21 B). Es zeigte sich, dass beide Glukosidaseinhibitoren keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität von FLT-3 *in vitro* haben.

Die Hemmung der Phosphorylierung von FLT-3 ITD läßt sich daher lediglich mit einem verhinderten Eintritt in die ER-Qualitätskontrolle erklären. In einem weiteren Versuch testeten wir den bereits klinisch zugelassenen Glukosidasehemmstoff Miglustat, ein N-Butylderivat von Deoxynojirimycin. Wir inkubierten die hämatopoetischen Zelllinien EOL-1 und MV4-11 für drei Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Miglustat und untersuchten die Tyrosinphosphorylierung von FLT-3 Immunpräzipitaten im Immunoblot. Es zeigte sich eine starke Hemmung der FLT-3 ITD Autophosphorylierung bei 1 mM, während der  $IC_{50}$  zwischen 0.1 und 1 mM lag. Interessanterweise war die Autophosphorylierung von FLT-3 WT nicht beeinflusst (s.Abb. 3.21 C und D).

Da die Aktivität und daher Phosphorylierung von FLT-3 ITD ausschlaggebend für sein transformierendes Potential ist, testeten wir, ob die Hemmung von Glukosidasen auch einen Einfluss auf FLT-3 ITD abhängige Proliferation von hämatopoetischen Zellen hat. Die murine myeloide Zelllinie 32D wächst Interleukin-3 (IL-3) abhängig. 32D Zellen, die stabil mit FLT-3 ITD transfiziert wurden, hingegen wach-

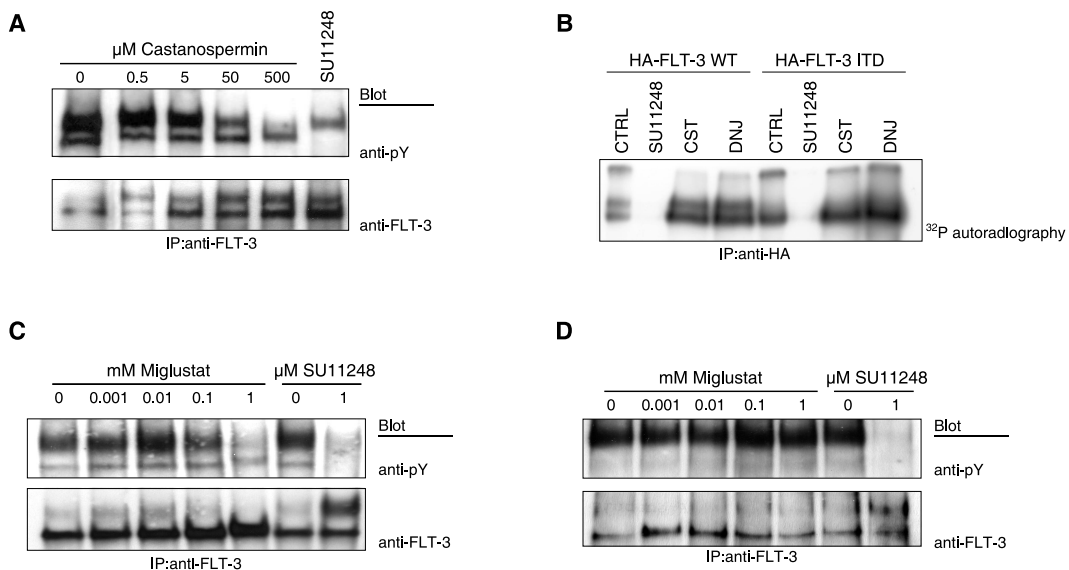


Abbildung 3.21: **Glukosidaseinhibitoren hemmen die Phosphorylierung von FLT-3 ITD, nicht aber die FLT-3 Kinaseaktivität.** **A:** Mit FLT-3 ITD stabil transfizierte 32D Zellen wurden für drei Stunden mit den angegebenen Konzentrationen an Castanospermin inkubiert. FLT-3 wurde immunopräzipitiert und Tyrosinphosphorylierung im Immunoblot analysiert. **B:** HA-getagtes FLT-3 WT bzw. ITD wurde in HEK293 Zellen exprimiert und durch Immunopräzipitation isoliert. Immunopräzipitate wurden auf Eis mit 5 mM Castanospermin oder Deoxynojirimycin inkubiert und anschließend einem in-vitro Kinaseassay mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma\text{ATP}$  unterzogen. Die Inkorporation an radioaktivem Phosphat wurde mittels Autoradiographie nach SDS-PAGE ermittelt. MV4-11 (**C**) und EOL-1 (**D**) Zellen wurden für drei Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von Miglustat inkubiert, FLT-3 immunopräzipitiert und Tyrosinphosphorylierung im Immunoblot analysiert. Als Hemmkontrolle diente die Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  SU11248.

sen IL-3 unabhängig, wenngleich sie auf die Aktivität von FLT-3 ITD angewiesen sind. Wir inkubierten 32D FLT-3 ITD Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Castanospermin oder Deoxynojirimycin für 48 Stunden und untersuchten ihr Proliferationsverhalten im MTT-Test. Parallel dazu führten wir den gleichen Versuch in der Gegenwart von IL-3 durch, um das toxische Potential der Hemmstoffe auszumachen. Wir konnten beobachten, dass die Glukosidasehemmstoffe die ITD-abhängige Proliferation dosisabhängig hemmen konnten, nicht jedoch die IL-3-abhängige (s. Abb. 3.22). Während 2 mM Miglustat die Proliferation auf 20 % der Kontrolle reduzieren konnte, war 1 mM Castanospermin etwas weniger potent und erzeugte eine 40 %-ige Hemmung.

Der Eintritt von FLT-3 ITD in den ER-Qualitätskontrollzyklus ist offensicht-

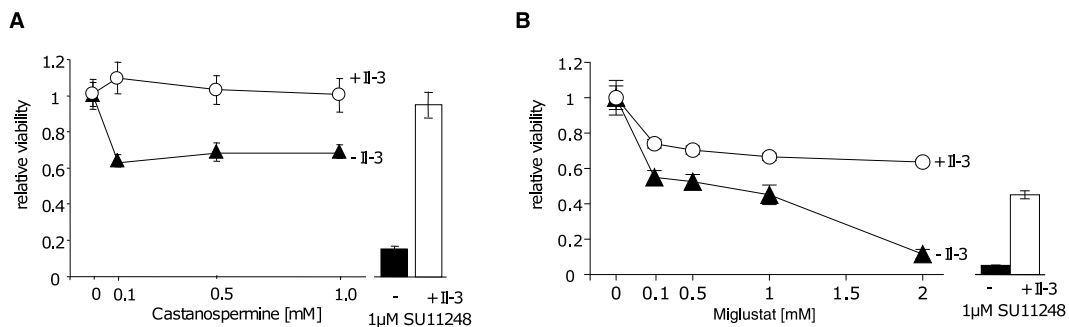


Abbildung 3.22: **Glukosidaseinhibitoren hemmen die FLT-3 ITD abhängige Proliferation von 32D Zellen.** Mit FLT-3 ITD stabil transfizierte 32D Zellen wurden für 48 h mit den angegebenen Konzentrationen an Castanospermin (A) oder Miglustat (B) inkubiert und die Umsetzung von MTT bei 570 nm gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse von acht Parallelbestimmungen.

lich wichtig, um seine volle Kinaseaktivität und sein transformierendes Potential zu erhalten. Die Inhibition von molekularen Komponenten, durch die dieser Eintritt verhindert werden kann, stellt daher ein neues pharmakologisches Prinzip zur Hemmung der FLT-3 ITD-abhängigen Transformation dar.

### Beteiligung von ERp57 an der Stabilität von FLT-3 ITD

Da weder Calnexin, noch Calreticulin alleine verantwortlich für die Retention von FLT-3 ITD sind, untersuchten wir, ob möglicherweise andere Komponenten der ER-Qualitätskontrolle dafür wichtig sind. Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, ist ERp57 durch die Bildung transienter, kovalenter Intermediate an der ER-Retention von Glykoproteinen beteiligt. Wir depletierten daher ERp57 mittels synthetischer siRNA-Oligos in mit FLT-3 WT oder ITD stabil transfizierten HEK293 Zellen und untersuchten die Auswirkungen auf das Reifungsverhalten von FLT-3 mittels Immunoblot (s.Abb. 3.23 A).

Wir waren überrascht zu sehen, dass die Expression von FLT-3 ITD nach ERp57 Depletion stark reduziert war. ERp57 schien demnach eine wichtige Rolle bei der Stabilität von FLT-3 ITD zu spielen. Um dieses Ergebnis mit einer anderen Methode zu bestätigen, wählten wir einen pharmakologischen Ansatz. Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, lassen sich Proteindisulfidomerasen durch NEM oder Bacitracin hemmen. Wir wählten HEK293 Zellen, die entweder mit FLT-3 WT, FLT-3 ITD oder

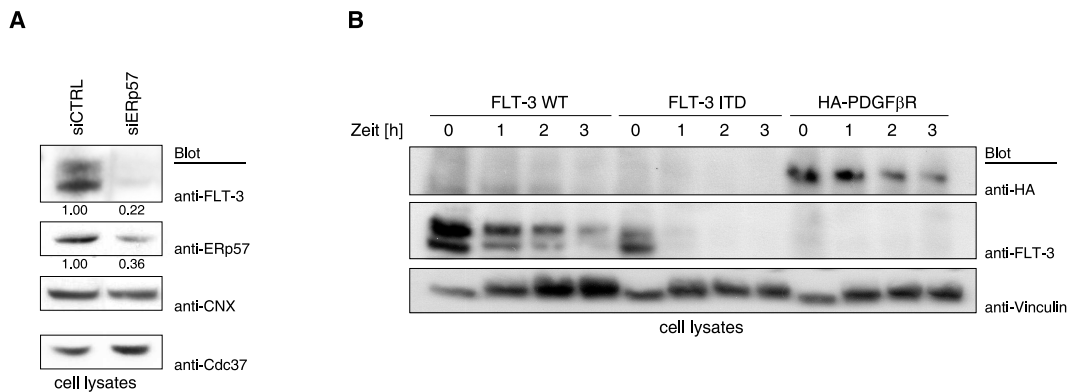


Abbildung 3.23: **ERp57 ist wichtig für die Stabilität von FLT-3 ITD.** **A:** Mit FLT-3 ITD stabil transfizierte HEK293 Zellen wurden mit siRNA-Oligos gegen ERp57 transfiziert und für 48 h inkubiert. Die Expression von FLT-3 und ERp57 wurde im Immunoblot von Lysataliquoten untersucht und densitometrisch ausgewertet. Relative Expressionsspiegel sind unter dem Blot angegeben. **B:** HEK293 Zellen, die mit FLT-3 WT, ITD oder PDGFβR stabil transfiziert waren, wurden mit 100 μM NEM für die angegebene Zeitdauer inkubiert. Die Expression der jeweiligen Rezeptortyrosinkinase wurde im Immunoblot von Lysataliquoten analysiert.

HA-getaggttem PDGFβ Rezeptor stabil transfiziert waren. Wir inkubierten diese Zellen mit 100 μM NEM für unterschiedliche Zeitdauern und untersuchten die Expression der Rezeptortyrosinkinasen im Immunoblot (s.Abb. 3.23 B). Während die Expression von FLT-3 WT, bzw. PDGFβR nach zwei bis drei Stunden auf etwa die Hälfte zurückging, war FLT-3 ITD bereits nach einer Stunde NEM-Behandlung im Immunoblot nicht mehr detektierbar. Da die Expression von FLT-3 ITD in diesem Experiment niedriger als der anderen Kinasen war, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, ob dies auf eine erhöhte Sensitivität von FLT-3 ITD gegenüber NEM zurückzuführen ist. Auch in EOL-1 und MV4-11 Zellen zeigte sich nach einer Stunde NEM-Behandlung, dass FLT-3 ITD im Gegensatz zu FLT-3 WT nicht mehr detektierbar war (s.Abb. 3.24 A). In MV4-11 Zellen war FLT-3 bereits nach 15 Minuten NEM-Behandlung nur noch zu 50 % detektierbar (s.Abb. 3.24 B). Behandlung von EOL-1 und MV4-11 Zellen mit 1 mM Bacitracin zeigte nach drei Stunden einen Abbau von FLT-3 ITD, nicht jedoch von FLT-3 WT. Erste Versuche mit 32D FLT-3 ITD Zellen zeigten, dass Bacitracin partiell die ITD-abhängige Proliferation dieser Zellen hemmen kann (Daten nicht gezeigt). Diese Versuche benötigen jedoch weiterer Verifizierung. Auch um herauszuarbeiten, ob FLT-3 ITD stärker sensitiv

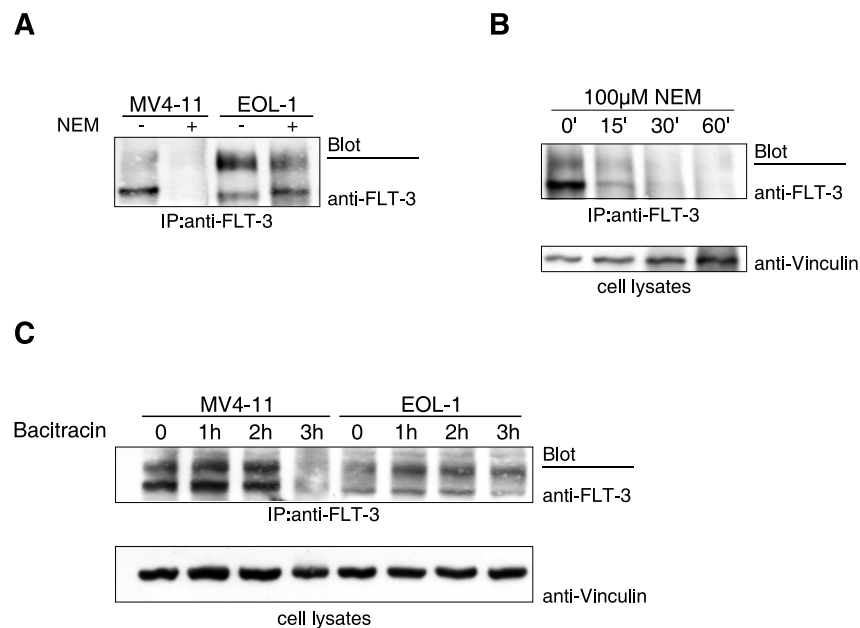


Abbildung 3.24: **NEM und Bacitracin induzieren den Abbau von FLT-3 ITD.** **A:** MV4-11 und EOL-1 Zellen wurden für eine Stunde mit 100 µM NEM inkubiert und Expression von FLT-3 im Immunoblot von FLT-3 Immunopräzipitaten analysiert. **B:** MV4-11 Zellen wurden für die angegebene Zeitdauer mit 100 µM NEM inkubiert und FLT-3 immunopräzipitiert. Expression von FLT-3 wurde im Immunoblot untersucht. **C:** MV4-11 und EOL-1 Zellen wurden für die angegebene Zeitdauer mit 1 mM Bacitracin inkubiert und FLT-3 immunopräzipitiert und im Immunoblot analysiert.

gegenüber PDI-Inhibitoren ist, sind weitere Experimente erforderlich.

ERp57 stellt aber dennoch ein neues pharmakologisches Zielmolekül dar, das die Stabilität von FLT-3 ITD, ähnlich wie HSP90, stark beeinflusst.

### 3.7 ER-verankertes FLT-3 WT als Transformationsmodell für FLT-3 ITD?

Unsere hier präsentierten Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Aktivierung von aberranten Signalwegen durch FLT-3 ITD durch seine von FLT-3 WT unterschiedliche Lokalisation zustande kommt. Wir entwickelten daher ein Modell, in dem FLT-3 WT erst an der Plasmamembran aktiv wird und "normale" Substrate phosphorylieren kann. FLT-3 ITD hingegen wird bereits im endoplasmatischen Retikulum ligandenunabhängig aktiv, hat Zugang zu "unnatürlichen" Substraten,

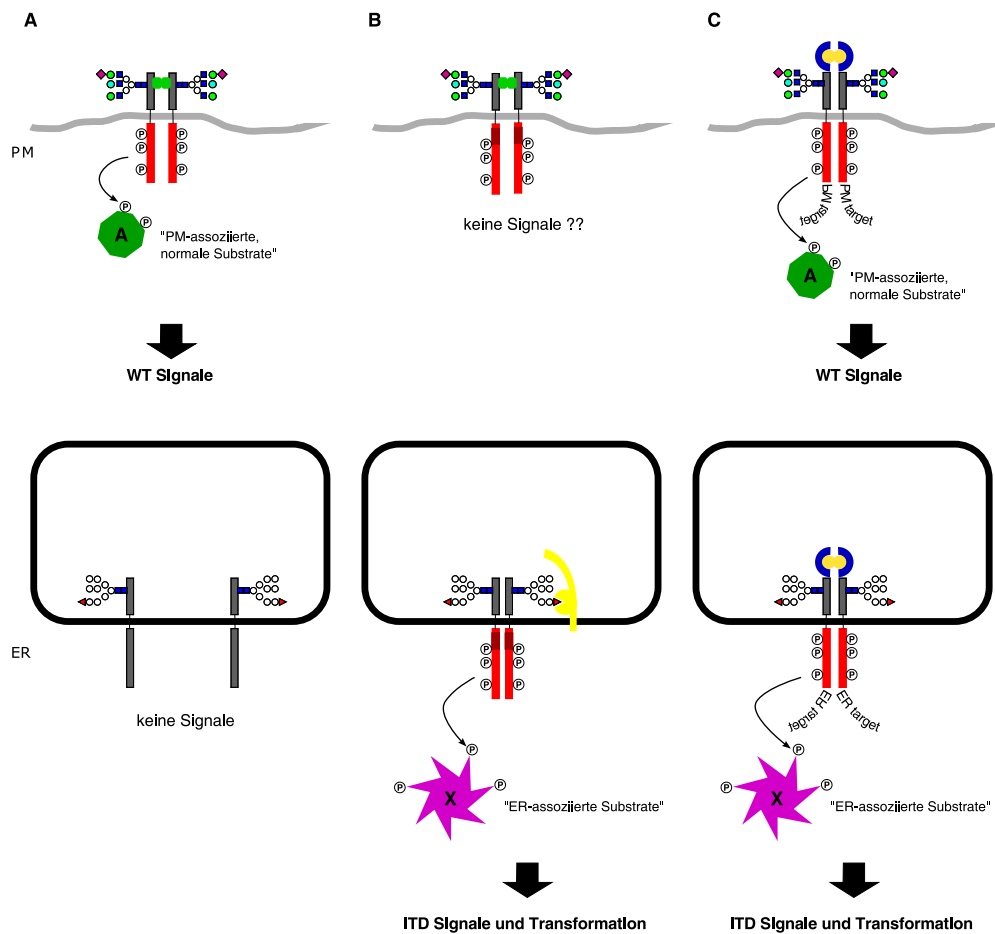


Abbildung 3.25: **Modell der ER-Lokalisationsabhängigen Transformation von FLT-3 ITD.** Der Qualitätsunterschied initiiert Signalwege zwischen FLT-3 WT (A) und FLT-3 ITD (B) lassen sich möglicherweise durch den unterschiedlichen Zugang zu Substraten erklären. C Aktivierung von ER-verankertem FLT-3 WT führt möglicherweise zur Aktivierung von ITD-typischen Signalwegen.

die phosphoryliert werden. Dadurch werden unterschiedliche Signalwege aktiviert und eine transformierende Wirkung entfaltet. Um diese Hypothese überprüfen zu können, entwickelten wir ein Expressionskonstrukt, durch das FLT-3 WT mittels eines ER-Retentionssignals ausschließlich im endoplasmatischen Retikulum verankert und mit Hilfe einer Dimerisierungsdomäne aktivierbar sein würde (s. Abb. 3.25). Im Folgenden soll kurz auf das Modellsystem eingegangen werden, ohne jedoch einen detaillierteren Blick auf die Klonierungsstrategien zu werfen.

Als Dimerisierungsdomäne wählten wir eine F36V Mutante von FKBP-12 (Clack-

son et al. [1998]). Ein synthetisches Dimerisierungsagenz AP20187 bindet an diese Mutante, nicht jedoch an FKBP-12 WT. Damit ist gewährleistet, dass endogen exprimiertes FKBP-12 nicht durch das Dimerisierungsagenz beeinflusst wird. In einem ersten Konstrukt fusionierten wir FKBP-12 F36V (im Folgenden als Fv1E bezeichnet) C-terminal an FLT-3, gefolgt von einem ER-Retentionssignal.

ER-residente Transmembranproteine verwenden hauptsächlich zwei Arten von ER-Retentionssignalen: ein Doppellysin- basiertes KKXX-Motiv, oder ein Doppel-Arginin (RXR)-basiertes (Shikano and Li [2003], Lotti et al. [1999]). In einem ersten Versuch fusionierten wir C-terminal der Fv1E-Domäne ein KKAA-Motiv. Ein AAAA-Motiv diente als Kontrollmotiv. Das Expressionskonstrukt wurde in HEK293 Zellen exprimiert, mit AP20187 stimuliert und im Immunoblot analysiert. Es zeigte sich, dass die ER-Retention nicht zufriedenstellend war. Interessanterweise war die komplex glykosylierte Form an der Plasmamembran mit AP20187 stimulierbar, nicht jedoch die Hochmannoseform, wenn man FLT-3 AAAA durch Brefeldin A- Behandlung im ER zurück hielt. Die schlechte ER-Retention kam vermutlich durch die große Distanz des Retentionsmotivs zur Membran zustande. Daher wählten wir in einem nächsten Ansatz ein RRR-Motiv, das wir zwischen FLT-3 und Fv1E fusionierten. Es zeigte sich, dass wiederum keine ER-Retention eintrat. Wir vermuteten, dass möglicherweise die Fv1E-Domäne einen Zugang an das RRR-Signal verhindert. Daher fusionierten wir die RRR-Sequenz C-terminal an FLT-3 und verzichteten auf die Fv1E-Domäne. Doch auch hier war nur eine sehr schwache ER-Retention zu beobachten.

Während unserer Klonierungsversuche isolierten wir zwei Klone, bei denen durch eine frame-shift Mutation ein RRR-Signal, eingebettet in eine 23-, bzw. 39-Aminosäuresequenz, entstand. Beide Klone zeigten, wenn in HEK293 Zellen exprimiert, eine vollständige ER-Retention. Wir nannten die entdeckten ER-Retentionsmotive RRR+1<sup>1</sup> bzw. RRR+2<sup>2</sup>. Mittels in-vitro Mutagenese mutierten wir die RRR-Sequenz zu AAA. Es entstanden die Kontrollmotive AAA+1 bzw. AAA+2.

<sup>1</sup>RRR+1: GVQVAGRRFDSAGGDYLP**RRR**AHLPPQARPDRLRGALHRDA

<sup>2</sup>RRR+2: **LPRRR**AHLPPQARPDRLRGALHRDA



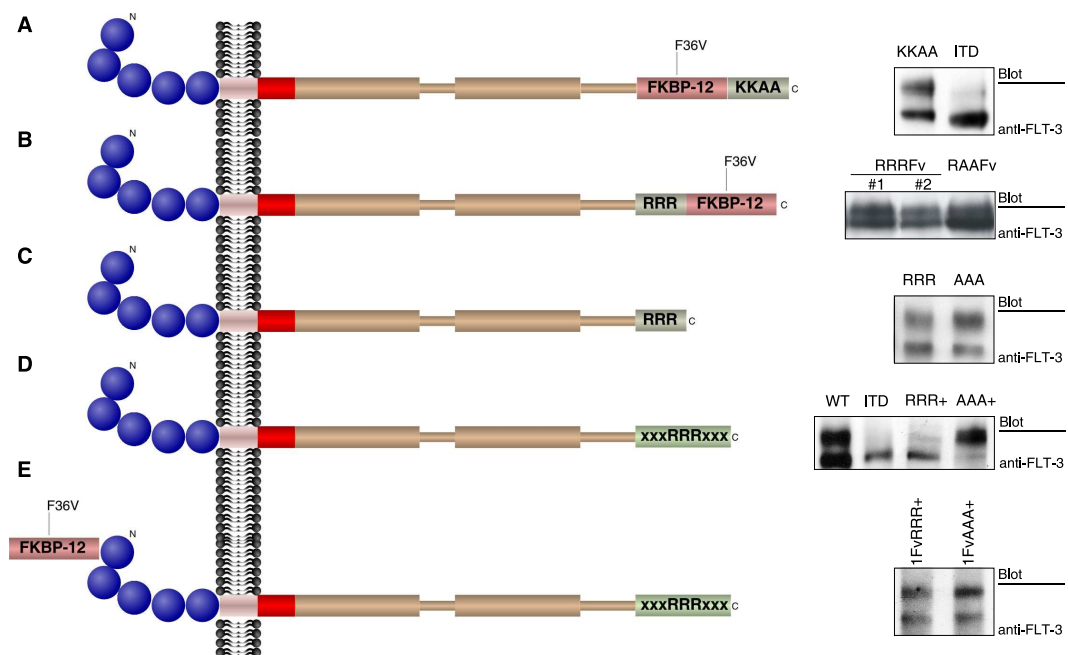


Abbildung 3.26: **ER-verankerter FLT-3 WT.** *linke Seite:* Domänenstruktur verschiedener FLT-3 WT Konstrukte mit ER-Retentionssignal. *rechte Seite:* HEK293 oder 32D Zellen wurden mit verschiedenen Konstrukten für ER-verankerten FLT-3 WT transfiziert. FLT-3 wurde immunopräzipitiert oder direkt aus Lysat-Aliquoten im Immunoblot analysiert.

FLT-3 WT in pAL-Vektor<sup>3</sup> wurde mit den genannten Motiven fusioniert und stabil in 32D Zellen transfiziert. Immunoblot-Analysen von FLT-3 Immunopräzipitaten aus diesen Zelllinien zeigten, dass FLT-3 WT sowohl mit RRR+1, als auch mit RRR+2 vollständig in der Hochmannoseform vorlag, während FLT-3 mit AAA+1 oder AAA+2 komplex glykosyliert wurde (s. Abb. 3.26 D). Das ausschließliche Vorhandensein der unreifen Hochmannoseform wurde als ER-Retention gewertet. Es erwies sich aber auch in FACS-Analysen, dass FLT-3 RRR+1 vollständig intrazellulär lokalisiert waren, während FLT-3 AAA+1 an der Zelloberfläche detektierbar war (Daten nicht gezeigt).

Um FLT-3 RRR+1/2 aktivieren zu können, fusionierten wir Fv1E, aber auch Fv2E (doppelte Dimerisierungsdomäne) N-terminal an FLT-3. Es zeigte sich aber leider, dass sowohl Fv1E als auch Fv2E die ER-Retention verhinderte und das Konstrukt nicht mehr vollständig im ER lokalisiert war. Wir wählten daher die FLT-3

<sup>3</sup>Zur Expression in 32D Zellen; die Expression von FLT-3 wird einem viralen LTR als Promotor kontrolliert



RRR+1 um eine Aktivierung von ER-verankertem FLT-3 durch die Einführung einer D835Y Mutation, zu erreichen. In ersten Experimenten zeigte sich, dass die Mutation keinen Einfluss auf die ER-Retention hat. Die Analyse von stabil transfizierten 32D Zellen steht noch aus.

Wir können also zeigen, dass es möglich ist, eine Rezeptortyrosinkinase mit einem RXR-basierten ER-Retentionssignal ausschließlich im endoplasmatischen Retikulum zu exprimieren. Dieses Modell soll nun verwendet werden, um Lokalisations-abhängige Transformation von FLT-3 zu studieren.

## Kapitel 4

# Diskussion und Ausblick

*“Nimm” sagte der Alte und entnahm aus der Mitte des goldenen Brustpanzers einen weißen und einen schwarzen Stein. “Sie heißen Urim und Thummim. Der schwarze bedeutet ja und der weiße nein. Wenn Du also die Zeichen nicht selber erkennen kannst, werden sie Dir nützlich sein. Stelle immer eine objektive Frage. Aber auf jeden Fall ist es besser, wenn Du Deine Entscheidungen selber fällst.*

aus: Paulo Coelho, Der Alchimist

### 4.1 Die Reifung von Rezeptortyrosinkinasen ist phosphotyrosinabhängig reguliert - FLT-3 ITD als Modell

Mutationen können Fehlfaltungen in Transmembranproteinen auslösen und ihre Oberflächenexpression verhindern. Das am besten untersuchte Beispiel hierbei ist die, bei zystischer Fibrose entdeckte  $\Delta F508$  Mutante des Chloridionenkanals CF-TR. Der fehlgefaltete Kanal assoziiert mit Chaperonen der Calnexin-, aber auch der HSP90- und HSP70-Familie, die ein Erscheinen des Kanals auf der Zelloberfläche verhindern. Es wurden aber auch Mutationen in Rezeptortyrosinkinasen wie RET oder Insulinrezeptor beschrieben, die zu einer intrazellulären Akkumulation des Rezeptors führen (Kjaer and Ibanez [2003], Rouard et al. [1999]). In allen gezeigten Fällen führten die Mutationen und die intrazelluläre Retention zu einem Verlust der Funktion.

Bei unseren Arbeiten an der, bei akuter myeloischer Leukämie entdeckten, ITD-Mutation von FLT-3, beobachteten wir, dass FLT-3 ITD hauptsächlich in einer 130 kDa-Form vorliegt. Wir konnten zeigen, dass diese Form eine Hochmannose-Glykan-

struktur trägt und sehr wahrscheinlich im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Es ist nicht auszuschließen, dass FLT-3 ITD auch im cis-GOLGI Kompartiment zu finden ist. Dort liegen Glykoproteine ebenfalls noch in der Hochmannoseform vor. Die Immunofluoreszenz-Untersuchungen gestatten nicht, eine zusätzliche Lokalisation im cis-GOLGI auszuschließen. Durch metabolische Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Cys/Met konnten wir sehen, dass die Akkumulation der FLT-3 ITD Hochmannoseform hauptsächlich durch eine gestörte Glykoproteinreifung zu erklären ist und nicht durch eine erhöhte Degradationskinetik. Man sollte an dieser Stelle nicht ausschließen, dass eine mögliche höhere Internalisierungs- und Abbaugeschwindigkeit der komplex glykosylierten Form von FLT-3 ITD, einen Beitrag zur beobachtbaren Reduktion der reifen Form liefert. Untersuchungen zur Degradationskinetik wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Wir konnten auch sehen, dass FLT-3 ITD phosphotyrosinabhängig im endoplasmatischen Retikulum retardiert wird. Unsere Daten legen nahe, dass FLT-3 ITD und andere hyperaktive Rezeptortyrosinkinasen durch die Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten werden. Wir stellen zudem die Hypothese auf, dass ER-lokalisierte RTK-Aktivität zur Transformation von Zellen beitragen könnte. Unterstützt wird diese Hypothese durch Befunde zu anderen onkogenen Rezeptortyrosinkinasen. Seit längerem ist bekannt, dass *v-sis* den PDGF Rezeptor zur Transformation benötigt. *V-sis* ist ein virales Onkogen, das ein Protein kodiert, das zu 92 % homolog zu PDGF-B ist. Interessanterweise bindet *v-sis* in einem intrazellulären Kompartiment an PDGFR, was zur Aktivierung und Retention von PDGFR im ER oder cis-GOLGI führt (Bejcek et al. [1989], Keating and Williams [1988]). Darüberhinaus konnten Lievens et al. [2004, 2006] kürzlich zeigen, dass aktivierende Mutanten des FGF-Rezeptors 3 ebenfalls im endoplasmatischen Retikulum retardiert werden und von dort aus auch Signalwege induziert, die Signalproteine wie Jak/STAT, MAP Kinase und PLC $\gamma$ /Pyk2 involviert. Corbacioglu et al. [2006] entdeckten vor kurzem ITD Mutationen bei c-Kit in pädiatrischen AML-Blasten. Obwohl in der Veröffentlichung nicht näher diskutiert, ist zu erkennen, dass auch c-Kit ITD schlechter reifte als c-Kit WT. In unseren Experimenten verwendeten

wir FLT-3 ITD als Modell, um die molekularen Mechanismen der ER-Retention hyperaktiver Rezeptortyrosinkinasen näher zu charakterisieren.

## **4.2 PTPasen als Regulatoren während der Biosynthese von Rezeptortyrosinkinasen**

In unseren Experimenten hatten wir gesehen, dass die Überexpression von PTPasen die Reifung von FLT-3 ITD begünstigte. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass PTPasen noch eine weitere Funktion während der Proteinreifung von RTKs haben. PTPasen können innerhalb der Zelle unterschiedliche Lokalisationen haben.

So sind PTPasen wie PTP1B, TC-PTP und SHP-1 mit dem ER, bzw. mit einem perinukleären Kompartiment assoziiert, während Transmembran-PTPasen vermutlich ausschließlich an der Plasmamembran aktiv sind. Die PTPase PTP-SL wurde am GOLGI-Apparat lokalisiert. Es läßt sich so ein einfaches Modell entwickeln, in dem RTKs während der Reifung in ER und GOLGI durch entsprechend lokalisierte PTPasen in einem inaktiven Zustand gehalten werden und so erst an der Plasmamembran aktiviert werden können (s. Abb. 4.1). Untersuchungen zu der ER-lokalisierten PTP1B und dem Insulinrezeptor scheinen dieses Modell zu stützen (Issad et al. [2005]). Hemmung oder Depletion von PTPasen sollte demnach auch zu einer Phosphorylierung unreifer RTKs und in der Konsequenz zu einer Retardierung im entsprechenden Kompartiment führen. Und in der Tat konnten wir diese Beobachtung sowohl nach genereller PTPase-Hemmung als auch nach selektiver PTPase-Depletion machen (Abb. 3.9). Dieses Modell bedarf jedoch noch weiterer experimenteller Verifizierung. Depletion Kompartiment-spezifischer PTPasen und anschließender Analyse des Reifungsverhaltens ausgewählter RTKs würde Auskunft über die Rolle spezifischer PTPasen an unterschiedlichen Stufen der RTK-Reifung geben. Für den Fall, dass sich oben genanntes Modell bestätigen sollte, wäre es interessant zu sehen, ob verschiedenartige RTKs bei der Reifung durch die gleichen, oder durch RTK-spezifische PTPasen kontrolliert werden.

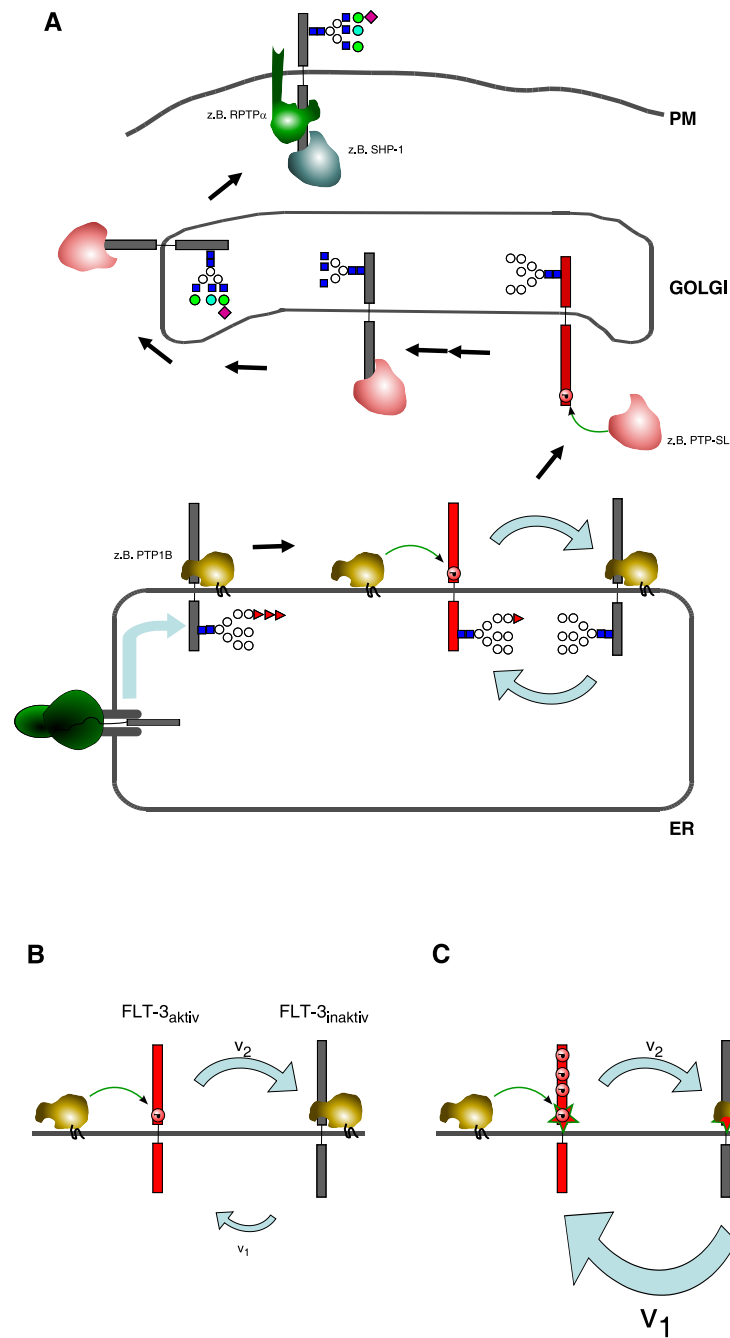


Abbildung 4.1: **PTPasen als Regulatoren der Transmembranproteinreifung.** **A:** Verschiedene PTPasen könnten RTKs an unterschiedlichen Stellen der Reifung negativ kontrollieren. Verlust der PTPase-Funktion führt zu hyperaktiver RTK, die in entsprechendem Kompartiment retardiert (roter Rezeptor). **B:** FLT-3 WT. **C:** FLT-3 ITD. Trotz gleicher Dephosphorylierungskinetik ( $v_2$ ) wie FLT-3 WT, ist FLT-3 ITD wegen mangelnder Autoinhibition und damit vermutlich erhöhter Rephosphorylierungskinetik ( $v_1$ ), in der Zelle hyperphosphoryliert.

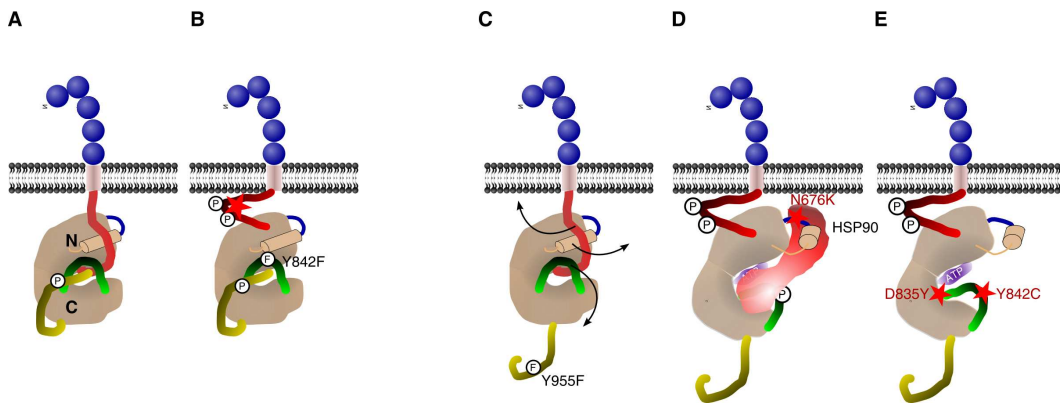


Abbildung 4.2: **Potentielle Konformationen einzelner FLT-3 Mutanten.** **A:**FLT-3 WT liegt unstimuliert in einer inaktiven, geschlossenen Konformation vor. Möglicherweise sorgt die Phosphorylierung von Y955 für eine inaktive Konformation des C-Terminus. **B:**Obwohl die Juxtamembrandomäne von FLT-3 ITD in einer offenen Konformation vorliegt, wird die Aktivierungsschleife und damit die Kinasedomäne durch eine Y842F Mutation in einer inaktiven Konformation gehalten. **C:**Durch Mutation von Tyr955 zu Phe, kann dieses nicht mehr phosphoryliert werden und der C-Terminus möglicherweise keinen Beitrag zur Autoinhibition liefern. Konformationsänderungen der  $\alpha$ C-Helix, der Juxtamembrandomäne und der Aktivierungsschleife werden begünstigt. **D und E:**Mutationen in der  $\alpha$ C $\beta$ 4-Schleife, oder in der Aktivierungsschleife begünstigen vermutlich eine aktive Konformation der Kinasedomäne. Die ER-Retention der N676K Mutante wird möglicherweise auch durch die verstärkte Assoziation mit HSP90 begünstigt.

### 4.3 Strukturelle und molekulare Aspekte der ER-Retention von FLT-3 ITD

#### Ladung oder Konformation?

In unseren Experimenten konnten wir sehen, dass die Hemmung der Kinaseaktivität von FLT-3 ITD durch Hemmstoffe oder die inaktivierende K644A Mutation zu einer effizienteren Reifung führte. Lys644 in FLT-3 ist invariant in der Familie der Kinasen und essentiell für den katalysierten Phosphotransfer (s. Kapitel 1.2). Lys $\rightarrow$ Ala Mutation beeinflusst die Kinaseaktivität auf zwei Arten: sowohl die Affinität für  $\text{Mg}^{2+} \cdot \text{ATP}$ , als auch für Peptidsubstrate wird stark erniedrigt. Begründet liegt diese Beobachtung vermutlich in einer starken Konformationsänderung der Kinasedomäne. Erklärbar ist dies durch die Interaktionen des invarianten Lys sowohl mit der sg.  $\alpha$ C-Helix, ATP, als auch mit der Aktivierungsschleife. Es ist also denkbar, dass bei FLT-3 ITD K644A die Konformation der Kinasedomäne gegenüber FLT-

3 ITD verändert ist. Kiyoi et al. [2002] hatten gezeigt, dass FLT-3 ITD mit FLT-3 WT ohne Ligandenstimulation heterodimerisieren kann. Man kann daher vermuten, dass FLT-3 ITD als konstitutives Dimer vorliegt. Arbeiten von Sorkin et al. [1991] hatten gezeigt, dass eine PDGF $\beta$ R K634A Mutante kaum Auswirkungen auf die ligandenstimulierte Internalisierung hat. Heldin et al. [1989] hatten zudem gezeigt, dass die ligandenabhängig Dimerisierung von PDGF $\beta$ R unabhängig von ATP und Phosphorylierung ist. Man kann daher vermuten, dass FLT-3 ITD K644A nach wie vor als konstitutives Dimer vorliegt, was jedoch noch eine experimentelle Verifizierung benötigt.

Die Phosphorylierung von Tyrosinen in der Aktivierungsschleife ist Teil des Aktivierungsmechanismus von vielen Rezeptortyrosinkinasen (s. Kapitel 1.2). In unseren Experimenten haben wir gesehen, dass eine Tyr842Phe Mutation eine inaktivierte Kinase zur Folge hatte. Eine kürzlich entdeckte Tyr842Cys Mutation war in unseren Überexpressionsexperimenten in COS-7 Zellen schwach im ER retardierte, zeigte jedoch keine Hyperaktivität. In 32D Zellen und Patientenblasten führte diese Mutation zu konstitutiver Aktivität (Kindler et al. [2005]). Wie vermutet ist also die Phosphorylierung und einhergehende Konformationsänderung der Aktivierungsschleife von FLT-3 wichtig für die Ausbildung einer offenen, aktiven Konformation der Kinasedomäne. Die Kinaseaktivität der Punktmutanten korrelierte invers mit der Reifungseffizienz (Abb. 3.13, 3.14). Man könnte daher vermuten, dass eine aktive Konformation der Aktivierungsschleife Auslöser für eine Retention im ER ist. Eine FLT-3 Y842C K644A Mutante hingegen reifte effizient. Es wird vermutet, dass die aktivierende Asp835Tyr Mutation ebenfalls zu einer aktiven Konformation der Aktivierungsschleife führt (s. Kap. 1.2). In Studien anderer Arbeitsgruppen allerdings ließ sich keine ER-Retention dieser Mutante erkennen. In unseren Experimenten war diese Mutante in Überexpressionsexperimenten nicht stabil (Daten nicht gezeigt). Es ist daher fraglich, ob eine aktive Konformation der Aktivierungsschleife der Auslöser der ER-Retention ist. Eine FLT-3 Y955F K644A Mutante reifte effizient i.Ggs. zur ER-retardierte FLT-3 Y955F Mutante. Die Rolle des C-Terminus von FLT-3 ist bisher vollkommen unklar. Die Untersu-

chung von C-terminalen Deletionsmutanten würden Aufschluss darüber geben, ob der C-Terminus eine autoregulatorische Rolle übernimmt, oder ob der beobachtete Effekt einer verschlechterten Reifung der FLT-3 Y955F Mutante auf die Ausschaltung eines spezifischen Signalweges zurückzuführen ist. Eine Asn676Lys Mutation in der  $\alpha$ C $\beta$ 4-Schleife von FLT-3 führte zur ER-Retention. Erklärbar wäre dies durch eine veränderte Positionierung der  $\alpha$ C-Helix, die aus einer Destabilisierung der  $\alpha$ C $\beta$ 4-Schleife resultieren könnte. Dadurch wäre vermutlich eine aktive Konformation der Kinasedomäne begünstigt. Aber auch die erhöhte HSP90-Assoziation könnte hierfür verantwortlich zeichnen (Abb.3.15, 3.16). Interessanterweise zeigte auch hier eine FLT-3 Asn676Lys Lys644Ala Mutante ein effizientes Reifungsverhalten.

Eine Lys644Ala Mutation war also in allen Fällen dominant und ermöglichte eine effiziente Reifung des Rezeptors. Untersuchungen zum CSF-1 Rezeptor hatten gezeigt, dass es zwei Gruppen von kinaseinaktivierenden Mutationen gibt. Eine, in der die Aktivierungsschleife eine aktive Konformation annehmen kann und eine, in der sie das nicht kann. Zur ersten Gruppe gehörte eine Arg900Ala Mutation, zur zweiten eine Lys616Ala Mutation (Uden et al. [1999]). Wie oben diskutiert, gehört die FLT-3 Lys644Ala Mutation in die zweite Gruppe. Eine FLT-3 Arg931Ala Mutation hingegen würde in die erste Gruppe fallen, in der die Aktivierungsschleife eine aktive Konformation annehmen kann. Laut Gibbs and Zoller [1991], hätte diese Mutation keinerlei Auswirkung auf die  $K_m$ -Werte bezüglich Substrat- oder ATP-Bindung, wohl aber auf  $k_{cat}$  und daher auf die Geschwindigkeit der Phosphatübertragung. In unseren Experimenten hatten wir gesehen, dass FLT-3 ITD Lys932Ala Arg933Ala effizient reifen konnte, was mit einer Kinaseinaktivierung korrelierte.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die ER-Retention von FLT-3 ITD sehr wahrscheinlich nicht auf eine spezifische Konformation zurückzuführen ist, auch nicht auf eine spezifische Phosphorylierung eines bestimmten Tyrosins, sondern dass vielmehr die globale Phosphorylierung des Rezeptors im ER eine effiziente Reifung verhindert.



**Was ist die molekulare Ursache für die ER-Retention von FLT-3 ITD?**

In unseren Experimenten haben wir gesehen, dass FLT-3 ITD mit Calnexin assoziiert und länger in der ER-Qualitätskontrolle verweilt. Wir konnten auch zeigen, dass diese Retention abhängig von der FLT-3 Kinaseaktivität war. Da die Assoziation von neu synthetisierten Transmembranproteinen mit Calnexin kotranslationell geschieht, muss man vermuten, dass die Kinasedomäne von FLT-3 ITD schon recht früh funktionsfähig ist. Unsere Befunde werfen die Frage auf, wie Calnexin FLT-3 ITD phosphotyrosinabhängig binden kann. Unsere Daten lassen auch vermuten, dass diese Assoziation lediglich über die Glykan-Lektin Interaktion vermittelt wird. Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, glukosyliert UGGT Glykoproteine, die nicht richtig gefaltet sind, die ihrerseits dann an Calnexin binden können. Es ist jedoch völlig unklar, wie eine Mutation, bzw. Aktivitäts/Konformationsänderung, die auf der zytoplasmatischen Seite der ER-Membran passiert, auf der lumenalen Seite durch UGGT detektiert wird. Es wäre denkbar, dass eine frühe Kinaseaktivität die endgültige Faltung des Rezeptors behindert und dieser Faltungsdefekt auch in der Extrazellulärdomäne detektierbar ist. Man könnte sich vorstellen, dass ähnlich wie eine Konformationsänderung der Extrazellulärdomäne nach Ligandenbindung über die Membran auf die Kinasedomäne übertragen wird, auch eine konstitutiv aktive Kinasedomäne zu einer konstitutiven Konformationsänderung der Extrazellulärdomäne führt. SiRNA Depletion von UGGT, oder die Verwendung von *ugt1<sup>-/-</sup>*-Zellen würde Auskunft darüber geben, ob UGGT und folglich die Reglukosylierung wirklich der kritische Schritt in der ER-Retention von FLT-3 ITD ist. Unsere siRNA Experimente zeigten, dass Calnexin Depletion alleine nicht ausreicht, FLT-3 ITD aus der ER-Qualitätskontrolle zu lösen. Man kann daher vermuten, dass Glukosylierung nicht alleine die ER-Retention bestimmt, sondern dass es noch einen weiteren Retentionsmechanismus geben muss. Es ist jedoch auch denkbar, dass die Calnexin-Depletion durch Calreticulin kompensiert wird. Experimente mit gleichzeitiger Depletion von Calnexin und Calreticulin könnten darüber Auskunft geben. Untersuchungen zu c-Kit deuten daraufhin, dass es auf der zytoplas-

matischen Seite möglicherweise ebenfalls eine Qualitätskontrolle mit Retentionsmechanismus gibt. Fusionierte man die zytoplasmatische Domäne von c-Kit WT mit einer Myristoylierungsdomäne von GAP-43, so war dieses Fusionsprotein an der Plasmamembran lokalisiert. Führt man in dieses Konstrukt eine aktivierende D816V Mutation ein, so war das Fusionsprotein im GOLGI lokalisiert (Xiang et al. [2007]).

In unseren Experimenten haben wir gesehen, dass HSP90 vermutlich bereits für die Stabilität der Hochmannoseform von FLT-3 ITD wichtig ist. Die Hochmannoseform von FLT-3 ITD K644A hingegen schien nicht Geldanamycin-sensitiv zu sein. Man könnte daher vermuten, dass HSP90 aktivitätsabhängig an die Hochmannoseform bindet und so eine Retention aktivierter RTKs im ER bewirkt. Da unsere Untersuchungen auf der Hemmung von HSP90 durch Geldanamycin beruhten, konnten wir keine Aussage über die Rolle von HSP90 bei der Retention von FLT-3 ITD machen, da nach Hemmung FLT-3 ITD degradiert wurde. Vermutlich rekrutiert HSP90 einen Proteinkomplex, der FLT-3 ITD nach HSP90-Hemmung ubiquitiniert und damit der Degradation zuführt. Man könnte dieses Problem umgehen, indem man HSP90 nicht hemmt, sondern mittels siRNA depletiert. Pulse-chase Experimente in solch depletierten Zellen würden dann Hinweise auf die Rolle von HSP90 bei der Reifung von FLT-3 geben. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass das HSP90 Cochaperon Aha1 an der Missfaltung und Retention des Chloridionenkanals CFTR  $\Delta$ F508 beteiligt ist (Wang et al. [2006]). Überexpression des Hsc70 Cochaperon HspBP1 hemmte die ER-ständige E3-Ubiquitinligase CHIP und stimulierte dadurch die Reifung von CFTR  $\Delta$ F508 (Alberti et al. [2004]).

Neben den bisher erwähnten Systemen, könnten aber auch andere Proteine an der ER-Retention beteiligt sein. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass das ER-Transmembranprotein Shisa in *Xenopus*-Zygoten mit den unreifen Formen des FGF Rezeptors und des Wnt-Rezeptors Frizzled interagiert und dadurch ihre ER-Retention bewirkt.

In unseren Untersuchungen zogen wir auch in Erwägung, ob möglicherweise ein internes ER-Retentionsmotiv zur Retention von FLT-3 ITD im ER führt. Wir

entdeckten im C-Terminus ein RKR-Motiv, das obendrein Wechselwirkungen mit der Juxtamembrandomäne in der inaktiven Konformation zeigte (Abb.3.18). Es war daher denkbar, dass in der aktiven Konformation dieses Motiv präsentiert würde und am ER zu einer Retention führen würde. Lediglich eine kinaseinaktivierende Mutation innerhalb dieses Motivs zeigte einen reifungsfördernden Effekt (s.oben). R<sub>931</sub>KR fungiert demnach nicht als internes ER-Retentionsmotiv. Vermutlich auch, weil beide wichtigen Arginine nicht nach außen, sondern in das Innere der Kinasedomäne zeigen und damit von außen her nicht gut zugänglich sind (s. Abb.3.18). Man kann jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht ausschließen, dass ein anderes internes ER-Retentionsmotiv in FLT-3 ITD demaskiert wird und für die ER-Retention verantwortlich ist.

#### **4.4 Aberrante ER-Lokalisation als potentiell transformierendes Prinzip - Modelle und pharmakologische Konsequenzen**

Unsere Experimente führen zu der Spekulation, dass eine Rezeptortyrosinkinase, die bereits im endoplasmatischen Retikulum aktiv ist, aufgrund ihrer aberranten Lokalisation, transformierend wirken könnte. Basierend auf dieser Annahme ist es vielleicht möglich, neuartige Hemm- und Therapieprinzipien zu entwickeln. Dazu ist es jedoch notwendig, das Modell experimentell zu untermauern.

##### **Kompartiment-spezifische Verankerung von RTKs.**

Bisherige Versuche, Rezeptortyrosinkinasen und andere Glykoproteine in intrazellulären Kompartimenten zurückzuhalten, basierten auf der Verwendung von Hemmstoffen wie Brefeldin A, Tunicamycin u.a. (Choudhary et al., paper submitted). Diese Hemmstoffe haben jedoch den Nachteil, dass die generelle Glykoproteinprozessierung gehemmt wird und die Zelle sich in einem unphysiologischen Zustand befindet. Seit einiger Zeit sind zwei verschiedene ER Retentionssignale in ER-residenten Transmembranproteinen bekannt. Ein KKXX-basiertes Motiv interagiert mit COP-I Coatamerproteinkomplex, während der Retentionsmechanismus

des RXR-basierten Motivs nicht näher bekannt ist. Letzteres spielt v.a. bei der Kontrolle des Oligomerisierungsstatus von  $K^+$ -Ionenkanälen, aber auch anderen Rezeptoren eine Rolle. Oligomerisierung führt zur Rekrutierung des Adaptorproteins 14-3-3, das durch die Bindung das RXR-basierte ER-Retentionsmotiv verdeckt. Der Ionenkanalkomplex kann anschließend an die Plasmamembran wandern (Michelsen et al. [2005]).

Unsere Experimente zeigen, dass eine C-terminal an FLT-3 fusionierte KKAA-Sequenz nicht ausreicht, um FLT-3 im ER zurückzuhalten. Dieser Befund könnte dadurch erklärt werden, dass das KKAA-Motiv nur bis zu einem Abstand von ca. 6 Å von der Plasmamembran ER-retardierend wirkt (Beobachtungen von Shikano and Li [2003]). Das RXR-Motiv hingegen wirkte erst ab ca. 6 Å, aber eben auch bei ca. 32 Å Abstand von der Plasmamembran ER-retardierend. Und in der Tat konnten wir eine ER-Retention von FLT-3 mit einer RRR-Sequenz erreichen. Dies gelang jedoch auch nur, wenn diese frei zugänglich in einer Peptidsequenz eingebettet lag. Interessanterweise entsprach die von uns gefundene Retentionssequenz (LPRRRAH...) nicht einer kürzlich veröffentlichten Konsensussequenz  $\Phi/\Psi/R$  **RXR**, wobei  $\Phi/\Psi$  entweder für eine aromatische oder für eine große hydrophobe Aminosäure steht (Michelsen et al. [2005]). Mutation von RRR nach AAA hingegen resultierte in einem Plasmamembran-ständigen FLT-3. Völlig unklar ist jedoch, warum eine N-terminale Fusion der Dimerisierungsdomäne Fv1E an FLT-3 mit dem C-terminal gelegenen RXR-Signal interferierte. An dieser Stelle ließe sich nur spekulieren, inwiefern das RXR-Signal möglicherweise, ähnlich wie in oben beschriebenen Ionenkanälen, in diesen Fusionsproteinen maskiert sein könnte. Ebenfalls schwer erklärbar ist, warum die Dimerisierungsdomäne Fv1E zwar an der Plasmamembran, nicht jedoch an der ER-Membran FLT-3 aktivieren konnte. Es ist denkbar, dass durch die lokale Konzentration an Chaperonen, Fv1E nicht freizugänglich ist und es nach AP-Zugabe so nicht zu einer Dimerisierung kommen kann. Dafür haben wir jedoch zu diesem Zeitpunkt keinerlei experimentelle Daten. Es ist jedoch auch denkbar, dass die Glykanstruktur der Extrazellulärdomäne einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität von FLT-3 hat (s.u.).

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Rezeptortyrosinkinase ROS in einer Glioblastomazelllinie in Fusion mit dem GOLGI-Protein FIG vorliegt und konstitutiv aktiv ist. In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung verwendeten Xiang et al. [2007] die GOLGI-Verankerungssequenz von FIG, um die zytoplasmatische Domäne von c-Kit im GOLGI-Apparat zu verankern was zur Transformation der transfizierten Zellen führte.

Es ist daher denkbar, das von uns präsentierte Konzept weiter auf den GOLGI-Apparat auszudehnen und die induzierten Signalwege zu betrachten. Es ist auch denkbar, dass neben Signalwegen aus intrazellulären Kompartimenten zusätzlich bestimmte Signalwege von der Plasmamembran initiiert werden müssen, damit eine effektive Transformation möglich ist (s.u. zu *v-fms*). Die Verwendung anderer Rezeptortyrosinkinasen in diesem Kontext könnte zur Untersuchung dienen, ob bei verschiedenen RTKs das transformierende Potential von der Lokalisation in zellulären Kompartimenten abhängig ist.

### **Glykosylierungsabhängige Aktivität von RTKs?**

Die Hemmung der Glukosidasen I und II durch die Hemmstoffe Castanospermin oder Miglustat führte zu einer Akkumulation von FLT-3 ITD in der unreifen, 130 kDa Hochmannoseform. Interessanterweise stellten wir auch fest, dass die Phosphorylierung von FLT-3 ITD nach Glukosidase-Hemmung drastisch zurückging, was aber nicht auf eine direkte Hemmung der Kinaseaktivität zurückzuführen war, wie *in-vitro* Kinaseassays zeigten. Die Hemmung des Eintritts von FLT-3 ITD in den Calnexinzyklus hemmt offensichtlich seine Kinaseaktivität. In einem ersten Modell erklärten wir uns diesen Befund folgendermaßen: FLT-3 ITD tritt in die ER-Qualitätskontrolle ein und ist an Calnexin assoziiert. Dadurch kommt es zu einer Konzentrierung von FLT-3 Molekülen, die eine Dimerisierung und trans-Autophosphorylierung begünstigen. Hemmt man diesen Schritt, kann FLT-3 ITD sich auf ER, GOLGI und Plasmamembran verteilen, auch wenn es zu keiner weiteren Glykanmodifikation kommt. In der Tat konnte gezeigt werden, dass in Castanospermin-behandelten Zellen Hämagglutinin-Moleküle an der Zelloberfläche erscheinen. Experimente, in

denen die Oberflächenlokalisation von FLT-3 ITD nach CST-Behandlung in 32D FLT-3 ITD mittels FACS-Analyse untersucht wird, werden gerade in unserer Arbeitsgruppe unternommen.

Ein zweites Modell, in dem die Glykanstruktur einen Einfluss auf die FLT-3 Aktivität hat, erscheint aber schlüssiger mit anderen Daten. Betrachtet man Phosphotyrosinsignale in Immunoblots von FLT-3 ITD Immunopräzipitaten (z.B. 3.21 A), so fällt auf, dass das relative Phosphotyrosinsignal der komplex glykosylierten Form wesentlich stärker als das der Hochmannoseform ist. Nach Glukosidasehemmung liegt FLT-3 ITD ausschließlich in der “niedrig aktiven” Hochmannoseform vor. Das legt den Schluss nahe, dass die Glykanstruktur einen regulatorischen Einfluss auf die Kinaseaktivität von FLT-3 ITD haben könnte. Untersuchungen zu anderen Glykoproteinen haben gezeigt, dass Glykosylierung einen faltungsfördernden und stabilisierenden Einfluss haben kann. Zusätzlich kann unterschiedliche Glykosylierung zu unterschiedlicher Signalqualität von Rezeptortyrosinkinasen führen (Haines and Irvine [2003]).

Ältere Untersuchungen zur onkogen Variante *v-fms* des CSF-1 Rezeptors zeigten eine wichtige Rolle der Glykanstruktur für die transformierende Aktivität von *v-fms* (Nichols et al. [1985], Hadwiger et al. [1986]). In Castanospermin-behandelten Zellen war *v-fms* nicht mehr an der Oberfläche detektierbar. Auch die *v-fms*-abhängige Transformation von Fibroblasten war durch Castanospermin hemmbar. Interessanterweise hatte Castanospermin aber keinerlei Effekt auf die Kinaseaktivität von *v-fms*.

Weitere Experimente, wie z.B. *in-vitro* Kinaseassays müssen zeigen, ob FLT-3 ITD mit einer Hochmannose-Glykanstruktur eine reduzierte Kinaseaktivität besitzt. Untersuchungen am EGF Rezeptor hingegen haben gezeigt, dass das Vorhandensein einer Glykanstruktur wichtig für die Kinaseaktivität ist. Es bestand jedoch kein Unterschied in der *in-vitro* Kinaseaktivität von EGFR-Immunopräzipitaten vor oder nach EndoH-Behandlung Fernandes et al. [2001]

**ERp57 als neues pharmakologisches Zielmolekül?**

In unseren Experimenten konnten wir sehen, dass Depletion der Oxidoreduktase ERp57 zu einer Destabilisierung von FLT-3 führte. Auch die Hemmung von Proteindisulfidisomerasen durch 1 mM Bacitracin oder 100  $\mu$ M N-Ethylmaleinimid hatte in ersten Experimenten eine Degradation von FLT-3 zur Folge. Weitere siRNA Depletionsexperimente müssen zeigen, ob dieser Effekt für ERp57 spezifisch ist, oder ob die Depletion anderer PDIs ebenfalls zu einer Destabilisierung von FLT-3 führt, was denkbar wäre, wenn man ihre wichtige Rolle bei der Proteinfaltung bedenkt. Wiederholungen der vorgestellten Experimente werden zeigen, ob es eine differentielle Sensitivität von FLT-3 WT und ITD auf die Depletion oder Hemmung von ERp57 gibt. Doch selbst wenn FLT-3 ITD nicht sensitiver wäre, ist eine Degradation von FLT-3 interessant, da potentielle ERp57- Hemmstoffe mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) kombiniert werden könnten. Eine Hemmstoffkombination würde zum einen die nötige Wirkdosis und so Nebenwirkungen im Patienten senken und zum anderen einer Resistenzbildung gegenüber TKIs vorbeugen. Das setzt jedoch auch voraus, dass die Hemmung von ERp57 andere Glykoproteine weit weniger in ihrer Reifung beeinträchtigt als FLT-3 (ITD). Erste Experimente mit PDGF $\beta$ R zeigten, dass dieser weit weniger sensitiv gegenüber Hemmung mit NEM war 3.23. Zusätzlich zeigten Proliferationsexperimente mit 32D ITD Zellen, dass Bacitracin zwar die ITD-abhängige, nicht jedoch aber eine IL-3 abhängige Proliferation hemmte und so nicht generell toxisch auf die Zellen wirkt. Nichtsdestotrotz lassen sich sowohl NEM, wegen seines unspezifischen Wirkmechanismus und Bacitracin, wegen seiner Nephrotoxizität bei systemischer Applikation, nicht klinisch einsetzen. Die hier vorgestellten Experimente sollten jedoch dazu ermutigen, spezifischere Hemmstoffe für die Klasse der Proteindisulfidisomerasen zu entwickeln.

# Literaturverzeichnis

- S. Alberti, K. Bohse, V. Arndt, A. Schmitz, and J. Hohfeld. The cochaperone hspbp1 inhibits the chip ubiquitin ligase and stimulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol Biol Cell*, 15(9):4003–10, 2004.
- M. M. Ali, S. M. Roe, C. K. Vaughan, P. Meyer, B. Panaretou, P. W. Piper, C. Prodromou, and L. H. Pearl. Crystal structure of an hsp90-nucleotide-p23/sba1 closed chaperone complex. *Nature*, 440(7087):1013–7, 2006.
- C. Appenzeller, H. Andersson, F. Kappeler, and H. P. Hauri. The lectin ergic-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Nat Cell Biol*, 1(6):330–4, 1999.
- B. E. Bejcek, D. Y. Li, and T. F. Deuel. Transformation by v-sis occurs by an internal autoactivation mechanism. *Science*, 245(4925):1496–9, 1989.
- P. Blume-Jensen and T. Hunter. Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411(6835):355–65, 2001.
- J. J. Caramelo, O. A. Castro, G. de Prat-Gay, and A. J. Parodi. The endoplasmic reticulum glucosyltransferase recognizes nearly native glycoprotein folding intermediates. *J Biol Chem*, 279(44):46280–5, 2004.
- HE. Chen, S. Chang, T. Trub, and BG. Neel. Regulation of colony-stimulating factor 1 receptor signaling by the sh2 domain-containing tyrosine phosphatase shptp1. *Mol Cell Biol*, 16(7):3685–97, 1996.
- E. Chevet, H. N. Wong, D. Gerber, C. Cochet, A. Fazel, P. H. Cameron, J. N. Gus-



- hue, D. Y. Thomas, and J. J. Bergeron. Phosphorylation by ck2 and mapk enhances calnexin association with ribosomes. *Embo J*, 18(13):3655–66, 1999.
- F. Chiara, S. Bishayee, CH. Heldin, and JB. Demoulin. Autoinhibition of the platelet-derived growth factor beta-receptor tyrosine kinase by its c-terminal tail. *J Biol Chem*, 279(19):19732–8, 2004.
- T. Clackson, W. Yang, LW. Rozamus, M. Hatada, JF. Amara, CT. Rollins, LF. Stevenson, SR. Magari, SA. Wood, NL. Courage, X. Lu, F. Cerasoli, M. Gilman, and DA. Holt. Redesigning an fkbp-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity. *Proc Nat Acad Sci*, 95(18):10437–10442, 1998.
- S. Corbacioglu, M. Kilic, M.-H. Westhoff, D. Reinhardt, S. Fulda, and K.-M. Debatin. Newly identified c-kit receptor tyrosine kinase itd in childhood aml induces ligand-independent growth and is responsive to a synergistic effect of imatinib and rapamycin. *Blood*, 108(10):3504–3513, 2006.
- U. G. Danilczyk, M. F. Cohen-Doyle, and D. B. Williams. Functional relationship between calreticulin, calnexin, and the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin. *J Biol Chem*, 275(17):13089–97, 2000.
- N. J. Dibb, S. M. Dilworth, and C. D. Mol. Switching on kinases: oncogenic activation of braf and the pdgfr family. *Nat Rev Cancer*, 4(9):718–27, 2004.
- L. Ellgaard and L. W. Ruddock. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep*, 6(1):28–32, 2005.
- H. Fernandes, S. Cohen, and S. Bishayee. Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (egfrviii/deltaegfr) expressed in cancer cells. *J Biol Chem*, 276(7):5375–83, 2001.
- C. S. Gibbs and M. J. Zoller. Rational scanning mutagenesis of a protein kinase identifies functional regions involved in catalysis and substrate interactions. *J Biol Chem*, 266(14):8923–31, 1991.

- J. Griffith, J. Black, C. Faerman, L. Swenson, M. Wynn, F. Lu, J. Lippke, and K. Saxena. The structural basis for autoinhibition of flt3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell*, 13(2):169–78, 2004.
- F. Gu, D. T. Nguyen, M. Stuible, N. Dube, M. L. Tremblay, and E. Chevet. Protein-tyrosine phosphatase 1b potentiates ire1 signaling during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 279(48):49689–93, 2004.
- A. Hadwiger, H. Niemann, A. Kabisch, H. Bauer, and T. Tamura. Appropriate glycosylation of the fms gene product is a prerequisite for its transforming potency. *Embo J*, 5(4):689–94, 1986.
- N. Haines and K. D. Irvine. Glycosylation regulates notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(10):786–97, 2003.
- F. G. Haj, P. J. Verveer, A. Squire, B. G. Neel, and P. I. Bastiaens. Imaging sites of receptor dephosphorylation by ptp1b on the surface of the endoplasmic reticulum. *Science*, 295(5560):1708–11, 2002.
- K. Harada, T. Okiyoneda, Y. Hashimoto, K. Ueno, K. Nakamura, K. Yamahira, T. Sugahara, T. Shuto, I. Wada, M. A. Suico, and H. Kai. Calreticulin negatively regulates the cell surface expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, 281(18):12841–8, 2006.
- K. Hasegawa, F. Martin, G. Huang, D. Tumas, L. Diehl, and A. C. Chan. Pest domain-enriched tyrosine phosphatase (pep) regulation of effector/memory t cells. *Science*, 303(5658):685–9, 2004.
- F. Heidel, F. K. Solem, F. Breitenbuecher, D. B. Lipka, S. Kasper, M. H. Thiede, C. Brandts, H. Serve, J. Roesel, F. Giles, E. Feldman, G. Ehninger, G. J. Schiller, S. Nimer, R. M. Stone, Y. Wang, T. Kindler, P. S. Cohen, C. Huber, and T. Fischer. Clinical resistance to the kinase inhibitor pkc412 in acute myeloid leukemia by mutation of asn-676 in the flt3 tyrosine kinase domain. *Blood*, 107(1):293–300, 2006.

- E. Heiss, K. Masson, C. Sundberg, M. Pedersen, J. Sun, S. Bengtsson, and L. Ronnstrand. Identification of y589 and y599 in the juxtamembrane domain of flt3 as ligand-induced autophosphorylation sites involved in binding of src family kinases and the protein tyrosine phosphatase shp2. *Blood*, 108(5):1542–50, 2006.
- D. Helbling, B. U. Mueller, N. A. Timchenko, A. Hagemeijer, M. Jotterand, S. Meyer-Monard, A. Lister, J. D. Rowley, B. Huegli, M. F. Fey, and T. Pabst. The leukemic fusion gene aml1-mds1-evi1 suppresses cebpa in acute myeloid leukemia by activation of calreticulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(36):13312–7, 2004.
- CH. Heldin, A. Ernlund, C. Rorsman, and L. Ronnstrand. Dimerization of b-type platelet-derived growth factor receptors occurs after ligand binding and is closely associated with receptor kinase activation. *J Biol Chem*, 264(15):8905–8912, 1989.
- A. Helenius and M. Aebi. Roles of n-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*, 73:1019–49, 2004.
- R. Hesketh. *The Oncogene FactsBook*. The FactsBook Series. Academic Press, London, 1st edition, 1995.
- T. Hessa, H. Kim, K. Bihlmaier, C. Lundin, J. Boekel, H. Andersson, I. Nilsson, S. H. White, and G. von Heijne. Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature*, 433(7024):377–81, 2005.
- C. Hetz, M. Russelakis-Carneiro, S. Walchli, S. Carboni, E. Vial-Knecht, K. Maundrell, J. Castilla, and C. Soto. The disulfide isomerase grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity. *J Neurosci*, 25(11):2793–802, 2005.
- AV. Hoffbrand, JE. Pettit, PAH. Moss, and D. Hoelzer. *Grundkurs Hämatologie*. Blackwell Verlag GmbH, Berlin, Wien, 2nd edition, 2003.
- T. Issad, N. Boute, S. Boubekur, and D. Lacasa. Interaction of ptpb with the insulin

- receptor precursor during its biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Biochimie*, 87(1):111–6, 2005.
- MR. Jackson, MF. Cohen-Doyle, PA. Peterson, and DB. Williams. Regulation of mhc class i transport by the molecular chaperone, calnexin (p88, ip90). *Science*, 263:384–387, 1994.
- M. T. Keating and L. T. Williams. Autocrine stimulation of intracellular pdgf receptors in v-sis-transformed cells. *Science*, 239(4842):914–6, 1988.
- N. Keith, A. J. Parodi, and J. J. Caramelo. Glycoprotein tertiary and quaternary structures are monitored by the same quality control mechanism. *J Biol Chem*, 280(18):18138–41, 2005.
- T. Kindler, F. Breitenbuecher, S. Kasper, S. Estey, F. Giles, E. Feldman, G. Ehninger, G. Schiller, V. Klimek, SD. Nimer, A. Gratwohl, CR. Choudhary, C. Mueller-Tidow, H. Serve, H. Gschaidmeier, PS. Cohen, C. Huber, and T. Fischer. Identification of a novel activating mutation (y842c) within the activation loop of flt3 in patients with acute myeloid leukemia (aml). *Blood*, 105(1):335–40, 2005.
- H. Kiyoi, M. Towatari, S. Yokota, M. Hamaguchi, R. Ohno, H. Saito, and T. Naoe. Internal tandem duplication of the flt3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia*, 12:1333–1337, 1998.
- H. Kiyoi, R. Ohno, R. Ueda, H. Saito, and T. Naoe. Mechanism of constitutive activation of flt3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene*, 21(16):2555–63, 2002.
- S. Kjaer and CF. Ibanez. Intrinsic susceptibility to misfolding of a hot-spot for hirschsprung disease mutations in the ectodomain of ret. *Hum Mol Genet*, 12: 2133–2144, 2003.
- G. Kozlov, P. Maattanen, J. D. Schrag, S. Pollock, M. Cygler, B. Nagar, D. Y. Tho-

- mas, and K. Gehring. Crystal structure of the bb' domains of the protein disulfide isomerase erp57. *Structure*, 14(8):1331–9, 2006.
- M. Kozlowski, L. Larose, F. Lee, DM. Le, R. Rottapel, and KA. Siminovitch. Shp-1 binds and negatively modulates the c-kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-kit juxtamembrane domain. *Mol Cell Biol*, 18(4):2089–99, 1998.
- P. Lee, J. Rao, A. Fliss, E. Yang, S. Garrett, and A. J. Caplan. The cdc37 protein kinase-binding domain is sufficient for protein kinase activity and cell viability. *J Cell Biol*, 159(6):1051–9, 2002.
- P. M. Lievens, C. Mutinelli, D. Baynes, and E. Liboi. The kinase activity of fibroblast growth factor receptor 3 with activation loop mutations affects receptor trafficking and signaling. *J Biol Chem*, 279(41):43254–60, 2004.
- P. M. Lievens, A. Roncador, and E. Liboi. K644e/m fgfr3 mutants activate erk1/2 from the endoplasmic reticulum through frs2 alpha and plc gamma-independent pathways. *J Mol Biol*, 357(3):783–92, 2006.
- L. V. Lotti, G. Mottola, M. R. Torrisi, and S. Bonatti. A different intracellular distribution of a single reporter protein is determined at steady state by kkxx or kdel retrieval signals. *J Biol Chem*, 274(15):10413–20, 1999.
- K. Michelsen, H. Yuan, and B. Schwappach. Hide and run. arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. *EMBO Rep*, 6(8):717–722, 2005.
- Y. Minami, H. Kiyoi, Y. Yamamoto, K. Yamamoto, R. Ueda, H. Saito, and T. Naoe. Selective apoptosis of tandemly duplicated flt3-transformed leukemia cells by hsp90 inhibitors. *Leukemia*, 16:1535–1540, 2002.
- M. Molinari and A. Helenius. Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science*, 288(5464):331–3, 2000.

- M. Molinari, K. K. Eriksson, V. Calanca, C. Galli, P. Cresswell, M. Michalak, and A. Helenius. Contrasting functions of calreticulin and calnexin in glycoprotein folding and er quality control. *Mol Cell*, 13(1):125–35, 2004.
- M. Nakao, S. Yokota, T. Iwai, H. Kaneko, S. Horiike, K. Kashima, Y. Sonoda, T. Fujimoto, and S. Misawa. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 10:1911–1918, 1996.
- E. J. Nichols, R. Manger, S. I. Hakomori, A. Herscovics, and L. R. Rohrschneider. Transformation by the v-fms oncogene product: Role of glycosylational processing and cell surface expression. *Mol Cell Biol*, 5(12):3467–3475, 1985.
- Y. Oda, N. Hosokawa, I. Wada, and K. Nagata. Edem as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science*, 299(5611):1394–7, 2003.
- A. Ostman, C. Hellberg, and F. D. Bohmer. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat Rev Cancer*, 6(4):307–20, 2006.
- U. Ozcan, E. Yilmaz, L. Ozcan, M. Furuhashi, E. Vaillancourt, R. O. Smith, C. Z. Gorgun, and G. S. Hotamisligil. Chemical chaperones reduce er stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*, 313(5790):1137–40, 2006.
- T. Prince and R. L. Matts. Exposure of protein kinase motifs that trigger binding of hsp90 and cdc37. *Biochem Biophys Res Commun*, 338(3):1447–54, 2005.
- C. Ritter, K. Quirin, M. Kowarik, and A. Helenius. Minor folding defects trigger local modification of glycoproteins by the er folding sensor gt. *Embo J*, 24(9):1730–8, 2005.
- J. L. Rocnik, R. Okabe, J. C. Yu, B. H. Lee, N. Giese, D. P. Schenkein, and D. G. Gilliland. Roles of tyrosine 589 and 591 in stat5 activation and transformation mediated by flt3-itd. *Blood*, 108(4):1339–45, 2006.

- SM. Roe, MM. Ali, P. Meyer, CK. Vaughan, B. Panaretou, PW. Piper, Ch. Prodromou, and LH. Pearl. The mechanism of hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50<sup>cdc37</sup>. *Cell*, 116:87–98, 2004.
- M. Rouard, J. Bass, F. Grigorescu, TP. Garrett, CW. Ward, G. Lipkind, C. Jaffiole, DF. Steiner, and GI. Bell. Congenital insulin resistance associated with a conformational alteration in a conserved beta-sheet in the insulin receptor l1 domain. *J Biol Chem*, 274:18487–18491, 1999.
- M. M. Schittenhelm, K. W. Yee, J. W. Tyner, L. McGreevey, A. D. Haley, A. Town, D. J. Griffith, T. Bainbridge, R. M. Braziel, A. M. O’Farrell, J. M. Cherrington, and M. C. Heinrich. Flt3 k663q is a novel aml-associated oncogenic kinase: Determination of biochemical properties and sensitivity to sunitinib (su11248). *Leukemia*, 20(11):2008–14, 2006.
- D. Schmidt-Arras, J. Schwable, F. D. Bohmer, and H. Serve. Flt3 receptor tyrosine kinase as a drug target in leukemia. *Curr Pharm Des*, 10(16):1867–83, 2004.
- D. E. Schmidt-Arras, A. Bohmer, B. Markova, C. Choudhary, H. Serve, and F. D. Bohmer. Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol*, 25(9):3690–703, 2005.
- J. D. Schrag, J. J. Bergeron, Y. Li, S. Borisova, M. Hahn, D. Y. Thomas, and M. Cygler. The structure of calnexin, an er chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol Cell*, 8(3):633–44, 2001.
- L. Shang and T. B. Tomasi. The heat shock protein 90-cdc37 chaperone complex is required for signaling by types i and ii interferons. *J Biol Chem*, 281(4):1876–84, 2006.
- S. Shikano and M. Li. Membrane receptor trafficking: evidence of proximal and distal zones conferred by two independent endoplasmic reticulum localization signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(10):5783–8, 2003.

- T. Shimamura, AM. Lowell, JA. Engelman, and GI. Shapiro. Epidermal growth factor receptors harboring kinase domain mutations associate with the heat shock protein 90 chaperone and are destabilized following exposure to geldanamycins. *Cancer Res*, 65(14):6401–8, 2005.
- L. Silvennoinen, J. Myllyharju, M. Ruoppolo, St. Orru, M. Caterino, KI. Kivirikko, and P. Koivunen. Identification and characterization of structural domains of human erp57. *J Biol Chem*, 279(14):13607–13515, 2004.
- T. Solda, N. Garbi, G. J. Hammerling, and M. Molinari. Consequences of erp57 deletion on oxidative folding of obligate and facultative clients of the calnexin cycle. *J Biol Chem*, 281(10):6219–26, 2006.
- A. Sorkin, B. Westermarck, CH. Heldin, and L. Claesson-Welsh. Effect of receptor kinase inactivation on the rate of internalization and degradation of pdgf and the pdgf receptor. *J Cell Biol*, 112(3):469–478, 1991.
- E. Swanton, S. High, and P. Woodman. Role of calnexin in the glycan-independent quality control of proteolipid protein. *Embo J*, 22(12):2948–58, 2003.
- S. C. Taylor, P. Thibault, D. C. Tessier, J. J. Bergeron, and D. Y. Thomas. Glycopeptide specificity of the secretory protein folding sensor udp-glucose glycoprotein:glucosyltransferase. *EMBO Rep*, 4(4):405–11, 2003.
- T. Tenev, SA. Bohmer, R. Kaufmann, S. Frese, T. Bittorf, T. Beckers, and FD. Bohmer. Perinuclear localization of the protein-tyrosine phosphatase shp-1 and inhibition of epidermal growth factor-stimulated stat1/3 activation in a431 cells. *Eur J Cell Biol*, 79(4):261–71, 2000.
- N. K. Tonks. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(11):833–46, 2006.
- M. Uden, G. M. Morley, and N. J. Dibb. Evidence that downregulation of the m-csf receptor is not dependent upon receptor kinase activity. *Oncogene*, 18(26):3846–51, 1999.



- X. Wang, J. Venable, P. LaPointe, D. M. Hutt, A. V. Koulov, J. Coppinger, C. Gurkan, W. Kellner, J. Matteson, H. Plutner, J. R. Riordan, J. W. Kelly, 3rd Yates, J. R., and W. E. Balch. Hsp90 cochaperone *aha1* downregulation rescues misfolding of *cftr* in cystic fibrosis. *Cell*, 127(4):803–15, 2006.
- H. N. Wong, M. A. Ward, A. W. Bell, E. Chevet, S. Bains, W. P. Blackstock, R. Solari, D. Y. Thomas, and J. J. Bergeron. Conserved in vivo phosphorylation of calnexin at casein kinase ii sites as well as a protein kinase c/proline-directed kinase site. *J Biol Chem*, 273(27):17227–35, 1998.
- Z. Xiang, F. Kreisel, J. Cain, A. Colson, and M. H. Tomasson. Neoplasia driven by mutant *c-kit* is mediated by intracellular, not plasma membrane, receptor signaling. *Mol Cell Biol*, 27(1):267–82, 2007.
- W. Xu, M. Marcu, X. Yuan, E. Mimnaugh, C. Patterson, and L. Neckers. Chaperone-dependent *e3* ubiquitin ligase chip mediates a degradative pathway for *c-erbB2/neu*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20):12847–52, 2002.
- W. Xu, X. Yuan, Z. Xiang, E. Mimnaugh, M. Marcu, and L. Neckers. Surface charge and hydrophobicity determine *erbB2* binding to the hsp90 chaperone complex. *Nat Struct Mol Biol*, 12(2):120–6, 2005.
- J. C. Young, I. Moarefi, and F. U. Hartl. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol*, 154(2):267–73, 2001.

## Anhang A

### Danksagung

Manchmal ist es schwer gerechterweise Dank zu sagen,  
Ohne dass sich manche Leut beklagen.  
Auch möchte ich niemanden vergessen,  
Ohn' dessen Hülfe ich vom Immunoblot zerfressen,  
heut' noch würde forschen wie besessen.

Das ganze Institute of Molecular Cell Biology,  
War mir wie 'ne cosy family.  
Und doch ein Wort zu Diesem oder Jenen,  
Würd ich gerne noch erwähnen:

**SFB604 und Mildred Scheel Stiftung** - für das Brot auf meinem Teller

**Metzgerei Trautner, Kirch Ehrenbach** - für die Wurst dazu

**Meine Eltern und mein Bruder** - für die geduldige Unterstützung und die mannigfaltig leckeren Essen, die ich mit meinen Freunden im Labor teilen durfte

**Antje, Astrid, Christian, Hauke, Kamal, Lutz und andere** - für viiiel Spaß, Musik, Gespräche und echte Freundschaft in und außerhalb des Labors

**Kamal** - neben oben, auch noch für die zahlreichen kulinarischen Leckereien in und außerhalb des Labors

**Manuela Döring** - dafür, dass sie mit ihrer Arbeit uns den Rücken frei hält

**Julia Maroldt und Caroline Steinbrücker** - für die Hilfe bei einigen Experimenten.

**Dorith Schmidt und Andrea Uecker** - für viele tiefsinnige Gespräche, Anregungen und das Gefühl zuhause zu sein.

**Luchezar Karagyzov** - für die Lehre, genau hinzusehen, dass Kontrollen über alles gehen, die ruhige Art zu denken, die historischen, literarischen und politischen Diskussionen, von denen ich viel gelernt habe.

**Annette Böhmer** - für die intensive und herzliche Zusammenarbeit, für einige Abbildungen in dieser Arbeit, für die philosophischen Momente

**Frank Böhmer** - für die herzliche Art, den Scharfsinn und die Aufmunterung, die Freiheit die er mir ließ, das Machtwort, das mich vor dem Verzetteln rettete, die Arbeitsgruppe, die er schuf und dass ich in fachlicher, aber auch in menschlicher Weise von ihm lernen konnte.

Den beiden letzt genannten für die familiäre Krönung.

Die Dissertation wurde mit  $\text{\LaTeX}$  gesetzt.

Abbildungen wurden mit Gimp 2.2.8 ([www.gimp.org](http://www.gimp.org)) und Inkscape 0.42.2 ([www.inkscape.org](http://www.inkscape.org)) erstellt.

## **Anhang B**

# **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, Literatur und persönlichen Mitteilungen angefertigt habe.

Jena, den 02.01.2007

Dirk Schmidt-Arras

## **Anhang C**

# **Erklärung zur Bewerbung**

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad doctor rerum naturalium beworben habe und dass ich weder früher, noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des oben genannten akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe. Die Promotions-Ordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt.

Jena, den 02.01.2007

Dirk Schmidt-Arras

## Anhang D

# Curriculum vitae

### persönliche Angaben

Name: Schmidt-Arras  
Vorname: Dirk  
Geburtsdatum: 29. Mai 1977  
Geburtsort: Forchheim/Bayern  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

Jahr	Schule
1983-1987	Grundschule
1987-1996	Ehrenbürg-Gymnasium Forchheim; Abschluss mit dem Abitur

### Hochschulbildung

Jahr	Institut/Universität	Abschluss	
1997-1999	Universität Bayreuth	Vordiplom	
1999-2002	Friedrich-Schiller-Universität Jena	Diplom mie/Molekularbiologie	Bioche-
2001-2002	Diplomarbeit am Institut für Molekulare Zellbio- logie		
2002-2007	Promotionsarbeit am Institut für Molekulare Zellbio- logie		

## Anhang E

# Wissenschaftliche Arbeiten

### Publikationen

#### 2003

Burger R, Bakker F, Guenther A, Baum W, **Schmidt-Arras D**, Hideshima T, Tai YT, Shringarpure R, Catley L, Senaldi G, Gramatzki M, Anderson KC.: Functional significance of novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) for human myeloma cell growth and survival., *Br J Haematol.* 2003 Dec;123(5):869-78

#### 2004

**Schmidt-Arras D.**, Schwäble J., Böhmer F.-D. and Serve H.: Flt3 receptor tyrosine kinase as a drug target in leukemia, *Curr Pharm Des.* 2004;10(16):1867-83

#### 2005

Diana Imhof, Karin Wieligmann, Kornelia Hampel, Doreen Nothmann, Mohammad S. Zoda, **Dirk Schmidt-Arras**, Martin Zacharias, Frank-D. Böhmer, and Siegmund Reissmann: Design and Biological Studies of Linear and Cyclic Phosphopeptide Ligands of the N-terminal SH2 Domain of Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1, *J Med Chem*, 2005; 48(5):1528-39

**Schmidt-Arras, D.**, Böhmer, S.-A., Markova, B., Choudhary, Ch., Serve, H. and Böhmer, F.-D.: Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases, *Mol Cell Biol*, 2005:25(9):3690-703

## 2006

Stuible, M., Zhao, L., Aubry, I., **Schmidt-Arras, D.**, Böhmer, F.-D., Li, C.J. and Trembly, M.L.: Cellular Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase 1B by Uncharged Thioxothiazolidinone Derivatives. *Chembiochem*, 2006: 7:1-9

## Posterpräsentationen und Vorträge

### 2002

6th Joint Meeting of the Signaltransduction society, Weimar(D), Poster Präsentation:

*The PTPases SHP-1 and PTP-PEST are involved in the regulation of FLT-3 signalling pathways*

### 2003

Cold Spring Harbor meeting on Protein Phosphorylation and Cell Signalling, New York (USA), Poster Präsentation:

*A role of SHP-1 in the maturation and signalling of FLT-3*

CellSignals Jena, "Signalling Complexes", Jena (D), Poster Präsentationen:

1. *Protein Phosphorylation as a determinant for maturation of FLT-3*

2. *Analysis of the genomic basis of complex patterns of multifunctional signalling proteins - exemplified by SHP-1 promoter computation*

SFB Symposium "Molecular Mechanisms of Intracellular Transport", Heidelberg (D), Poster Präsentation:

*Tyrosine phosphorylation as a novel quality parameter in receptor tyrosine kinase maturation*



**2005**

Cold Spring Harbor meeting on Protein Phosphorylation and Cell Signalling, New York (USA), Vortrag:

*Tyrosine phosphorylation entails entrapment of FLT-3 ITD into the ER quality control*

7<sup>th</sup> Young Scientists Meeting of the German Society of Cell Biology, Vesicular Trafficking, Jena (D), Poster Präsentation:

*Tyrosine phosphorylation entails entrapment of FLT-3 ITD within the ER quality control*

**2006**

First ESH/AACR Conference on Molecular basis for targeted therapy for leukemia, Cascais (P), Poster Präsentation:

*Entrapment of FLT-3 ITD within the ER*

**Förderungen**

Die Arbeit an der Dissertation wurde mit Mitteln aus dem Sonderforschungsbereich SFB604 (2002-2004) und der Deutschen Krebshilfe (2005-2007) gefördert.

2003 und 2005: Stipendium zur Teilnahme an der Cold Spring Harbor Konferenz: teilweise Erstattung der Registrationsgebühr

2006: Marie Curie Actions Award: kompletter Gebührenerlass und freie Unterkunft während der ESH/AACR Konferenz in Cascais

## Tyrosine Phosphorylation Regulates Maturation of Receptor Tyrosine Kinases

Dirk-E. Schmidt-Arras,<sup>1</sup> Annette Böhmer,<sup>1</sup> Boyka Markova,<sup>1</sup> Chunaram Choudhary,<sup>2</sup> Hubert Serve,<sup>2</sup> and Frank-D. Böhmer<sup>1\*</sup>

*Institute of Molecular Cell Biology, Jena University Hospital, Jena,<sup>1</sup> and Department of Internal Medicine, Hematology, and Oncology, University of Münster, Münster,<sup>2</sup> Germany*

Received 12 August 2004/Returned for modification 14 September 2004/Accepted 16 January 2005

**Constitutive activation of receptor tyrosine kinases (RTKs) is a frequent event in human cancer cells. Activating mutations in Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT-3), notably, internal tandem duplications in the juxtamembrane domain (FLT-3 ITD), have been causally linked to acute myeloid leukemia. As we describe here, FLT-3 ITD exists predominantly in an immature, underglycosylated 130-kDa form, whereas wild-type FLT-3 is expressed predominantly as a mature, complex glycosylated 150-kDa molecule. Endogenous FLT-3 ITD, but little wild-type FLT-3, is detectable in the endoplasmic reticulum (ER) compartment. Conversely, cell surface expression of FLT-3 ITD is less efficient than that of wild-type FLT-3. Inhibition of FLT-3 ITD kinase by small molecules, inactivating point mutations, or coexpression with the protein-tyrosine phosphatases (PTPs) SHP-1, PTP1B, and PTP-PEST but not RPTP $\alpha$  promotes complex glycosylation and surface localization. However, PTP coexpression has no effect on the maturation of a surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus. The maturation of wild-type FLT-3 is impaired by general PTP inhibition or by suppression of endogenous PTP1B. Enhanced complex formation of FLT-3 ITD with the ER-resident chaperone calnexin indicates that its retention in the ER is related to inefficient folding. The regulation of RTK maturation by tyrosine phosphorylation was observed with other RTKs as well, defines a possible role for ER-resident PTPs, and may be related to the altered signaling quality of constitutively active, transforming RTK mutants.**

Cellular receptors for growth factors, hormones, cytokines, and antigens are postrationally modified with N-linked, branched carbohydrate chains. Nascent polypeptide chains become initially glycosylated with a mannose-rich branched oligosaccharide in the endoplasmic reticulum (ER). Then, the glycoproteins are subjected to partial deglycosylation by several selective glycosidases, eventually enabling transfer to the Golgi compartment and more complex glycosylation (9). This process, designated glycoprotein maturation, is coupled to stringent quality control in the ER (4, 10). Correct folding is monitored by a complex system comprising, among other components, the chaperones calnexin and calreticulin, the oxidoreductase ERp57, and the glycosylation enzymes UDP-glucose glucosyltransferase and glucosidases I and II. Improperly folded glycoproteins are tagged by reversible glucosylation, enabling their interactions with calnexin and calreticulin and leading to their retention in the ER (4). Properly folded glycoproteins can dissociate from the chaperones and proceed to the Golgi compartment for further glycosylation.

The receptor tyrosine kinase (RTK) Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT-3) is expressed in multiple hematopoietic lineages (21, 22). Constitutively active FLT-3 mutants, notably, versions harboring internal tandem duplications in the juxtamembrane domain (FLT-3 ITD) and versions with point mutations in the kinase activation loop, have been found in approximately 30% of acute myeloid leukemia cases (28, 38). Activated versions of

FLT-3 are characterized not only by constitutive signaling but also by a different signaling quality, which is connected to their transforming capacity. Hallmarks of altered signaling are a strong activation of STAT5a and of STAT response genes, pronounced antiapoptotic effects, and the suppression of myeloid cell differentiation (25, 26, 34). The occurrence of active FLT-3 mutants is associated with a poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia, and FLT-3 is considered a promising target for therapy (for reviews, see references 33 and 35). Tyrosine kinase inhibitors from different structural families, including AG1296 (39), SU11248 (29), PKC412 (42), and CEP-701 (17), have been shown to inhibit the signaling of activated FLT-3. Some of these compounds are presently in clinical trials.

In our analysis of FLT-3 signaling, we observed inefficient maturation of FLT-3 ITD and its reduced expression at the cell surface. The systematic investigation of these phenomena revealed that the maturation of FLT-3 ITD is impaired by its constitutive kinase activity. Entrapment by the chaperone calnexin, and therefore ER retention, indicates decreased efficiency of folding of FLT-3 ITD. This previously unrecognized mechanism appears to be generally relevant for RTKs and has several testable implications for the mechanism of transformation of constitutively active RTKs and for the cellular roles of protein-tyrosine phosphatases.

### MATERIALS AND METHODS

**DNA constructs.** A PCR-amplified triple-hemagglutinin (HA) tag was fused by PCR to a DNA fragment corresponding to a sequence 3' downstream of an FLT-3 internal NdeI site. The PCR-fused fragment was subcloned with NdeI/HindIII into FLT-3-expressing pcRITOPPO (26). HA-tagged FLT-3 was subcloned with NotI/HindIII into pcDNA3.1(–). FLT-3 was PCR amplified and

\* Corresponding author. Mailing address: Institute of Molecular Cell Biology, Medical Faculty, Friedrich Schiller University, Drackendorfer Str. 1, D-07747 Jena, Germany. Phone: 49-3641-9325660. Fax: 49-3641-9325652. E-mail: i5frbo@rz.uni-jena.de.

cloned into pEGFP-N1, introducing a six-glycine linker between the FLT-3 C terminus and enhanced green fluorescent protein (EGFP).

The Stratagene QuikChange method was used to introduce KA and YF mutations into FLT-3 cDNAs. Note that the numbering of amino acids for wild-type FLT-3 is maintained for FLT-3 ITD, despite the ITD insertion, to allow better comparison.

Primer sequences are available on request.

For the creation of a pSuper PTP1B small interfering (siRNA) expression construct, the sequence 5'-TGG AAG AAG CCC AAA GGA G-3', corresponding to positions 221 to 239 of the human PTP1B cDNA, was used to design oligonucleotides (2) which were cloned into vector pSuper.retro.puro (Oligo-engine, Seattle, Wash.). An SHP-1 siRNA expression construct in the same vector was generated in an analogous manner with the sequence 5'-GAG GTG TCC ACG GTA GCT TCC-3', corresponding to positions 145 to 165 of the human SHP-1 cDNA (sequence kindly provided by H. Keilhack, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Mass.). All constructs were verified by DNA sequence analysis.

A eukaryotic expression construct for vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G) was kindly provided by S. Gutzkind. An expression construct containing enhanced cyan fluorescent protein (ECFP) fused to an ER-targeting sequence derived from calreticulin, including a KDEL retrieval sequence, was used as an ER localization marker (pECFP-ER). ECFP fused to a Golgi compartment-targeting sequence derived from human  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase was used as a Golgi compartment localization marker (pECFP-Golgi). Both constructs were purchased from BD Biosciences (Heidelberg, Germany). Expression constructs for the protein-tyrosine phosphatases (PTPs) PTP1B and PTP-PEST were kindly provided by A. Ullrich and M. Tremblay, respectively. An EGFP-SHP-1 expression construct was described earlier (37).

**Cells and reagents.** HEK293 cells were grown in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM)-F-12 medium (Gibco) containing 10% fetal calf serum (FCS) (Biochrom, Berlin, Germany). COS-7 cells were grown in DMEM (Gibco) containing 10% FCS. MV4-11 and THP-1 cells, kindly provided by S. Scholl (Department of Internal Medicine, Jena University Hospital), were grown in RPMI 1640 (Biochrom) containing 10% heat-inactivated FCS. Agarose beads linked to lectin from *Galanthus nivalis*, wortmannin, bis-indolylmaleimide I (BisI), neuraminidase (type V; N2876) from *Clostridium perfringens*, and brefeldin A were obtained from Sigma (Taufkirchen, Germany). PP1 and geldanamycin were obtained from Alexis (Grünberg, Germany). Biotinylated lectins from *Dolichos biflorus* (DBA), *G. nivalis* (GNA), *Ricinus communis* (RCA<sub>120</sub>), *Glycine max* (soybean; SBA), *Sambucus nigra* (SNA), and *Ulex europaeus* (UEA) were purchased from Vector Laboratories (Peterborough, United Kingdom). Agarose-linked streptavidin, streptavidin coupled to horseradish peroxidase (HRP), and HRP-coupled RCA<sub>120</sub> lectin were obtained from Sigma.

AG1296 was previously described (39). SU11248 was kindly provided by Marie O'Farrell (Sugen, Inc.). MG132 and bp(V)phen were obtained from Calbiochem (Schwalbach, Germany). Redivue PRO-MIX <sup>35</sup>S in vitro cell labeling mixture was obtained from Amersham Biosciences (Freiburg, Germany). Peptide *N*-glycosidase F (PNGase F) was obtained from Roche (Mannheim, Germany). Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H (endo-H) and the corresponding reaction buffers were obtained from New England Biolabs (Frankfurt, Germany).

Antibodies to the following were used: FLT-3\* (clone 4G8; recognizes the extracellular domain of FLT-3), pan-Erk, and PTP1B (monoclonal) (BD Biosciences); pY591 (3461S; recognizes phosphorylated Y591 in activated FLT-3) (Cell Signaling, Frankfurt, Germany); HA and vinculin (V248) (Upstate, Biomol, Hamburg, Germany); FLT-3 (sc-480), c-Src (sc-18), SHP-1 (sc-287), calnexin (sc-6465), c-Kit (sc-168), and GFP (sc-9996) (Santa Cruz, Santa Cruz, Calif.); and  $\beta$ -actin, mouse immunoglobulin G2a (IgG2a), mouse IgG1( $\kappa$ ), and VSV-G (ascitic fluid) (Sigma). Dichlorotriazinyl amino fluorescein (DTAF)-coupled anti-mouse IgG, Cy3-coupled anti-mouse IgG, and anti-rabbit IgG were obtained from Molecular Probes (Karlsruhe, Germany).

**FACS analysis.** MV4-11 and THP-1 cells were indirectly labeled with FLT-3\* antibody or mouse IgG1( $\kappa$ ) as an isotype control and with DTAF-coupled goat anti-mouse IgG according to standard protocols. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis was performed with a FACSCalibur (Becton Dickinson) instrument. Subsequent data analysis was performed with WinMDI software.

**Immunoprecipitation and Western blotting.** Vesicle immunoprecipitation was performed as described by Waugh et al. (41). MV4-11 and THP-1 cells were suspended in 4.3 M glycerol in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) for 10 min. Cells then were resuspended in homogenization buffer (0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 1 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, protease inhibitors) and homogenized. ER vesicles were isolated by adding 0.5  $\mu$ g of anticalnexin antibody and 60  $\mu$ l of protein G-Sepharose and incubating the mixture at 4°C overnight. Beads were washed three times with washing buffer (0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl [pH

7.4], 150 mM NaCl) and boiled in 30  $\mu$ l of 2 $\times$  sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) sample buffer. Samples were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting for FLT-3 and calnexin.

HEK293 cells were transfected by the calcium phosphate method, and COS-7 cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cell lysis with lysis buffer containing 0.5% Nonidet P-40 and immunoblotting were performed as previously described (15). For FLT-3-calnexin coimmunoprecipitation, cell lysates were incubated overnight with the corresponding antibody and 1 h with protein A/G-Sepharose beads, and the beads were sedimented and washed three times with 20 mM HEPES (pH 7.5)-150 mM NaCl-10% glycerol-0.1% Triton X-100 (HNGT buffer). Isolation of high-mannose FLT-3 was performed by incubation of cell lysates with 15  $\mu$ l of immobilized GNA lectin for 2 h and three washes with HNGT buffer. Treatment with PNGase F was performed as previously described (14). For digestion with endo-H, immunoprecipitates from  $5 \times 10^6$  cells with endogenous FLT-3 expression or  $2.4 \times 10^5$  transfected cells were subjected to denaturation with 25  $\mu$ l of denaturation buffer (supplied with the enzyme) at 95°C for 10 min. Then, 25  $\mu$ l of 2 $\times$  reaction buffer (supplied with the enzyme) and 0.5  $\mu$ l of endo-H were added, and the mixture was incubated at 37°C overnight. The reaction was terminated with SDS-PAGE sample buffer, and the reaction products were analyzed by immunoblotting.

Neuraminidase treatment of immunoprecipitates was done after denaturation with SDS-PAGE sample buffer. SDS was diluted to 0.5% with sodium phosphate buffer (pH 7.4; final concentration, 50 mM), and 0.5  $\mu$ l of neuraminidase was added to a 60- $\mu$ l sample. The mixture was incubated at 37°C for 2 h.

For lectin pull-down assays, THP-1 cells or FLT-3 KA-overexpressing COS-7 cells were lysed with lysis buffer containing 1% Nonidet P-40. The lysate of  $2 \times 10^7$  to  $2.5 \times 10^7$  THP-1 cells or  $1.2 \times 10^5$  transfected COS-7 cells was mixed with 40  $\mu$ g of biotinylated lectin and incubated with end-over-end rotation at 4°C overnight. Then, 35  $\mu$ l of a 1:1 suspension of agarose-coupled streptavidin was added, and incubation was continued for 1 h. The beads were washed three times with HNGT buffer and subsequently extracted with SDS-PAGE sample buffer at 37°C for 30 min. The samples were separated by SDS-7.5% PAGE and subjected to immunoblotting with anti-FLT-3 antibodies. For lectin blotting, FLT-3 was immunoprecipitated from lysates of THP-1 cells or transfected COS-7 cells. Immunoprecipitates corresponding to  $1 \times 10^7$  to  $2 \times 10^7$  THP-1 cells or  $2.5 \times 10^5$  transfected COS-7 cells per lane were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked by incubation with 2% Tween 20 in Tris-buffered saline (TBS) at room temperature for 20 min, washed three times with TBS, and incubated with biotinylated lectin (5 to 20  $\mu$ g/ml) or HRP-coupled lectin (1 to 5  $\mu$ g/ml) in TBS containing 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM CaCl<sub>2</sub> at room temperature overnight. The blots were either developed directly (HRP-coupled lectin) or incubated with HRP-conjugated streptavidin (0.2  $\mu$ g/ml) at room temperature for 1 h and then developed with enhanced chemiluminescence detection.

**PTP suppression by siRNA.** HEK293 cells were transiently transfected by the calcium phosphate method with 0.4  $\mu$ g of an expression construct for HA-tagged wild-type FLT-3 plus 4  $\mu$ g of the corresponding PTP1B siRNA construct per well of a six-well plate. Cells were allowed to express PTP1B siRNA for 4 days and then were lysed. For suppression of SHP-1 expression, THP-1 cells were infected with retroviruses containing the SHP-1 siRNA expression construct pSuper.retro.puro, produced in the Phoenix Amphopack packaging cell line (kindly provided by G. Nolan, Stanford University). Cells were selected for 10 days with 2  $\mu$ g of puromycin/ml and expanded. For suppression of PTP1B, THP-1 cells were transfected with siGENOME SMARTpool siRNAs (NM\_002827; Dharmacon) by using Nucleofector kit V and optimized protocol V-01 according to the instructions of the supplier (Amama GmbH, Cologne, Germany). Three days after transfection, cells were lysed and FLT-3 was immunoprecipitated. PTP1B expression, FLT-3 maturation, and loading ( $\beta$ -actin or vinculin) were analyzed by immunoblotting.

**Inhibitor treatments.** Cells were starved overnight in medium containing 0.5% FCS and then treated with kinase or signal transduction inhibitors at the following concentrations: 10  $\mu$ M AG1296, 1  $\mu$ M SU11248, 5  $\mu$ M PP1, 100 nM wortmannin, and 500 nM BisI. For treatment with geldanamycin and brefeldin A, transfected COS-7 cells were allowed to express FLT-3 constructs for 2 days. Cells then were treated for 6 h with either 3  $\mu$ M geldanamycin or 5  $\mu$ g of brefeldin A/ml before lysis. For the inhibition of total PTP activity, transfected COS-7 cells were left untreated or were treated with 1 mM bp(V)phen for up to 3 h. In some experiments, cells were preincubated with 25  $\mu$ M MG132 for 4 h before PTP inhibition.

**Pulse-chase labeling.** Pulse-chase analysis was carried out as previously described (21). Briefly, MV4-11 cells or transfected COS-7 cells were labeled for 20 min with 200  $\mu$ Ci of Redivue/ml in cysteine- and methionine-free DMEM, with subsequent chasing into DMEM containing 0.1 mM methionine and 0.2 mM

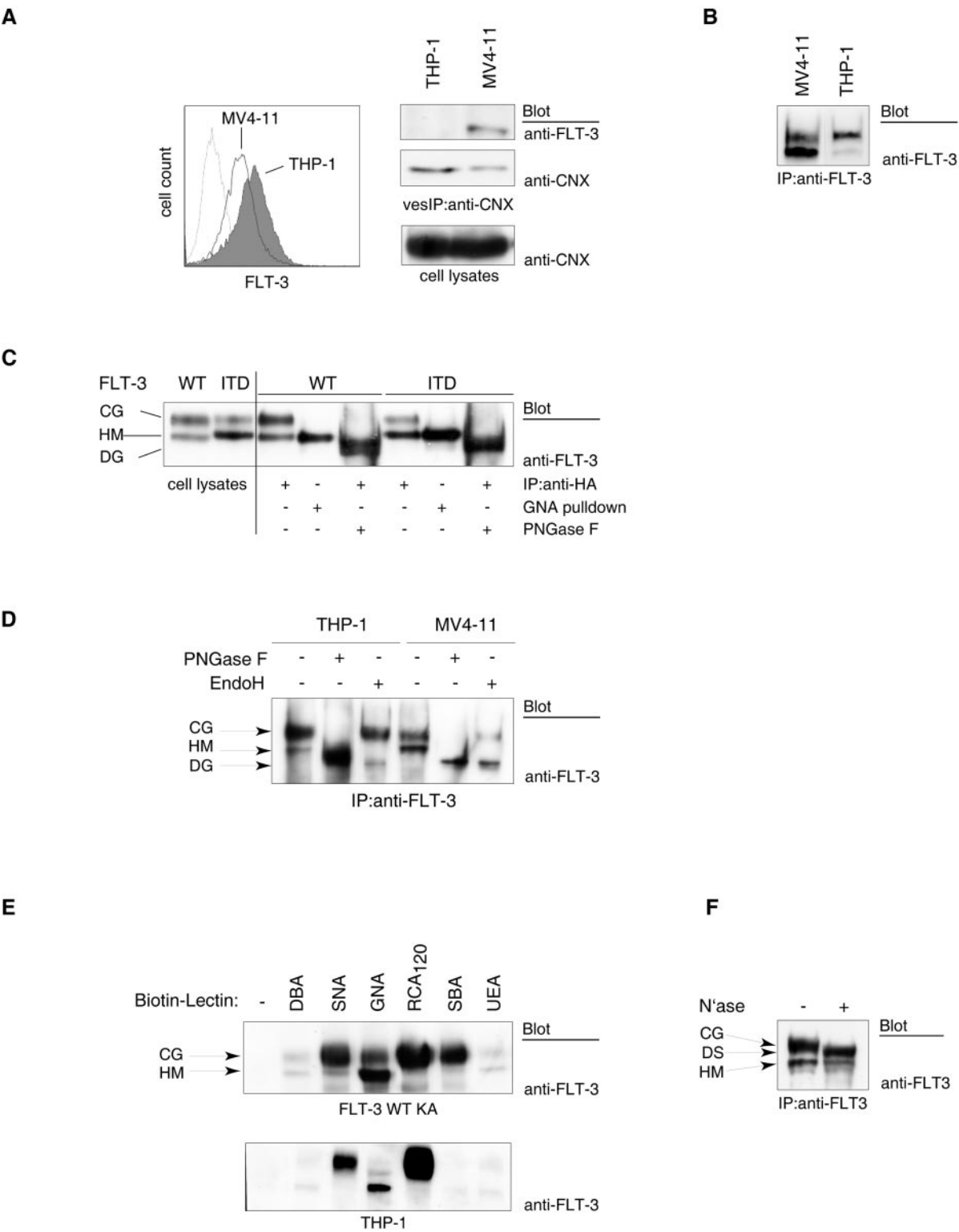
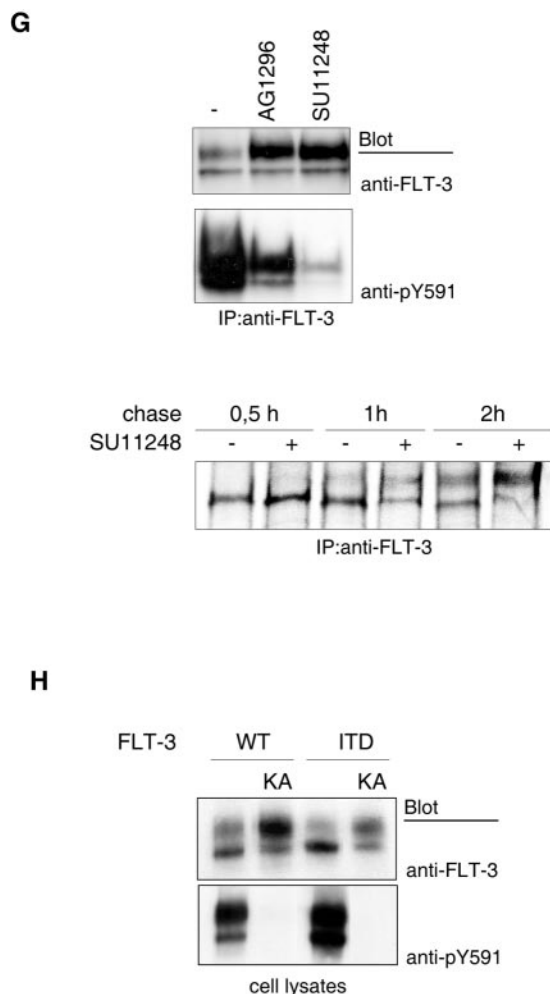


FIG. 1. Impaired maturation of the constitutively active FLT-3 ITD RTK. (A) (Left panel) Cell surface-localized FLT-3 was detected by FACS analysis of MV4-11 cells expressing FLT-3 ITD and of THP-1 cells expressing wild-type FLT-3. (Right panel) ER membrane vesicles from both cell lines were immunoprecipitated (vesIP) with anticalexin antibodies (anti-CNX) and analyzed for the presence of FLT-3 by immunoblotting. Equal levels of expression of calnexin in both cell lines were detected by immunoblotting of cell lysate aliquots. (B) FLT-3 ITD or wild-type FLT-3 was immunoprecipitated (IP) from MV4-11 cells or THP-1 cells, respectively, and analyzed by immunoblotting. (C) Cell lysates of HEK293 cells expressing either wild-type (WT) FLT-3 or FLT-3 ITD (HA tagged) either were subjected directly to immunoblotting or were first subjected to pull-down assays with immobilized GNA lectin or to immunoprecipitation and then digested with PNGase F and analyzed by immunoblotting. CG, complex glycosylated species; HM, high-mannose form; DG, deglycosylated form. (D) Wild-type FLT-3 or FLT-3 ITD was immunoprecipitated





from THP-1 cells or MV4-11 cells, respectively, and either mock treated or digested with endo-H or PNGase F. The digestion products were analyzed by immunoblotting with anti-FLT-3 antibodies. (E) Glycosylated proteins were affinity purified from lysates of FLT-3 K644A-expressing COS-7 cells (upper panel) or THP-1 cells (lower panel) with the indicated biotinylated lectins and agarose-linked streptavidin. For lectin selectivity and abbreviations, see the text and the legend to Fig. 2. The presence of FLT-3 in the glycoprotein pull-down assay was detected by immunoblotting with anti-FLT-3 antibodies. (F) FLT-3 was immunoprecipitated from THP-1 cells and either mock treated or digested with neuraminidase (N<sup>a</sup>se). DS, desialylated species. (G) (Upper panels) MV4-11 cells were treated with AG1296 or SU11248 for 3 h. Endogenous FLT-3 ITD was immunoprecipitated and detected by immunoblotting. (Lower panel) MV4-11 cells were metabolically labeled with [<sup>35</sup>S]methionine-[<sup>35</sup>S]cysteine for 20 min. An excess of unlabeled methionine-cysteine was added to the medium (chase) either in the presence or in the absence of 1  $\mu$ M SU11248. FLT-3 ITD was immunoprecipitated at the indicated times and analyzed by SDS-PAGE and fluorography. (H) Wild-type FLT-3, FLT-3 ITD, or their kinase-inactive K644A counterparts were expressed in COS-7 cells. The corresponding cell lysates were subjected to immunoblotting.

cysteine. Immunoprecipitated FLT-3 was analyzed by SDS-PAGE and fluorography.

**Immunohistochemistry studies.** COS-7 cells were grown on collagen-coated coverslips and transiently transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). The cells were allowed to express HA-tagged FLT-3 constructs for 1 day before fixation with 4% paraformaldehyde. After blocking was done with 10% normal

goat serum in phosphate-buffered saline (PBS)–1.5% bovine serum albumin (BSA), cells were incubated with FLT-3\* antibody (1:100) in PBS–1% BSA overnight, washed, and stained with Cy3-coupled anti-mouse IgG. Coexpression of EGFP-tagged FLT-3 or HA-tagged FLT-3 in COS-7 cells was performed with a number of other proteins. Cells were fixed with methanol at  $-20^{\circ}\text{C}$ , quenched with 0.1% NaBH<sub>4</sub> at room temperature, blocked as described above, and incubated with pY591 antibody (1:100) in TBS–1% BSA overnight and then with Cy3-coupled anti-rabbit IgG (1:600). For SHP-1 immunostaining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS, blocked as described above, and incubated with SHP-1 antibody at a dilution of 1:100 and then with Cy3-coupled anti-rabbit IgG as described above. Microscopy was done with a Zeiss LSM 510 confocal laser scanning microscope.

**Quantitative analysis.** Densitometric analysis of immunoblots was performed with NIH Image 1.61 software. The ratio of the amount of the complex glycosylated (150-kDa) form to the amount of the high-mannose (130-kDa) form was taken as a measure of maturation and is given in arbitrary units. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Data were analyzed by using paired two-tailed Student's *t* tests. A *P* value of  $<0.05$  was considered significant.

## RESULTS

**Tyrosine phosphorylation of FLT-3 is related to inefficient maturation.** When comparing the signaling mechanisms of wild-type FLT-3 with those of the transforming version FLT-3 ITD, we noted that FLT-3 ITD was usually detectable in smaller amounts at the cell surface than was the wild-type receptor. This finding is exemplified here for the cell lines THP-1, harboring wild-type FLT-3, and MV4-11, expressing FLT-3 ITD (Fig. 1A, left panel). Lower surface levels of FLT-3 seem to be caused not by different expression levels but rather by different cellular distributions. FLT-3 ITD was detectable in membrane vesicles enriched in ER membranes, obtained by immunoprecipitating membrane vesicles containing calnexin, an ER-resident molecule. Wild-type FLT-3 was not recovered in detectable amounts in this vesicle fraction (Fig. 1A, right panel).

It was previously reported that two species of FLT-3 can be observed in intact cells: a 150-kDa species representing a complex glycosylated, mature form and a 130-kDa species representing an underglycosylated, immature form which contains mannose-rich structures (21). We noted that in cells expressing FLT-3 ITD, predominantly a 130-kDa species was detectable, whereas for wild-type FLT-3, proportionally more of the 150-kDa species was detectable (Fig. 1B and Fig. 1C, left panel). The different proportions were not caused by solubility differences, since they were equally apparent when cells were solubilized directly with SDS-PAGE sample buffer. To confirm that the 130- and 150-kDa species differ in size because of differences in their glycosylation, we transiently overexpressed wild-type FLT-3 and FLT-3 ITD and treated the corresponding immunoprecipitates with PNGase F. Both receptor isoforms could be completely converted into an approximately 110-kDa molecule, proving that the observed size differences were caused by different modifications with N-linked carbohydrates. Since the material from both glycosylated receptor forms adds up in this band, its intensity is higher than those of the individual 150- and 130-kDa bands in the mock-treated controls. Furthermore, GNA lectin, which is selective for mannose-rich structures (36), interacted specifically with the 130-kDa species of both FLT-3 and FLT-3 ITD, further supporting its identity as a high-mannose form (Fig. 1C, right panel). Finally, the 130-kDa form was selectively deglycosylated upon digestion

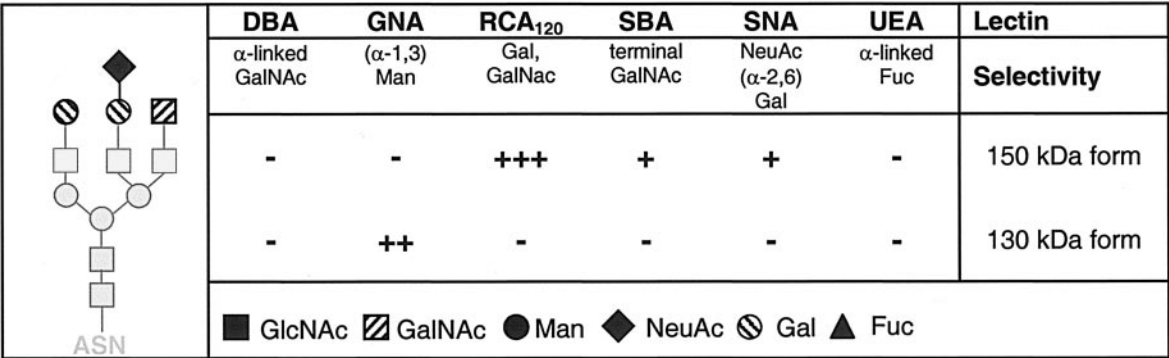


FIG. 2. Reactivity of FLT-3 with lectins in blotting experiments. Lectin reactivity is given in a semiquantitative scale ranging from – (no reactivity) to +++ (very strong reactivity). In the left panel, structural elements for which there is direct evidence from blotting and pull-down assays are shown in black type, and other elements are shown in gray type, in analogy with literature data.

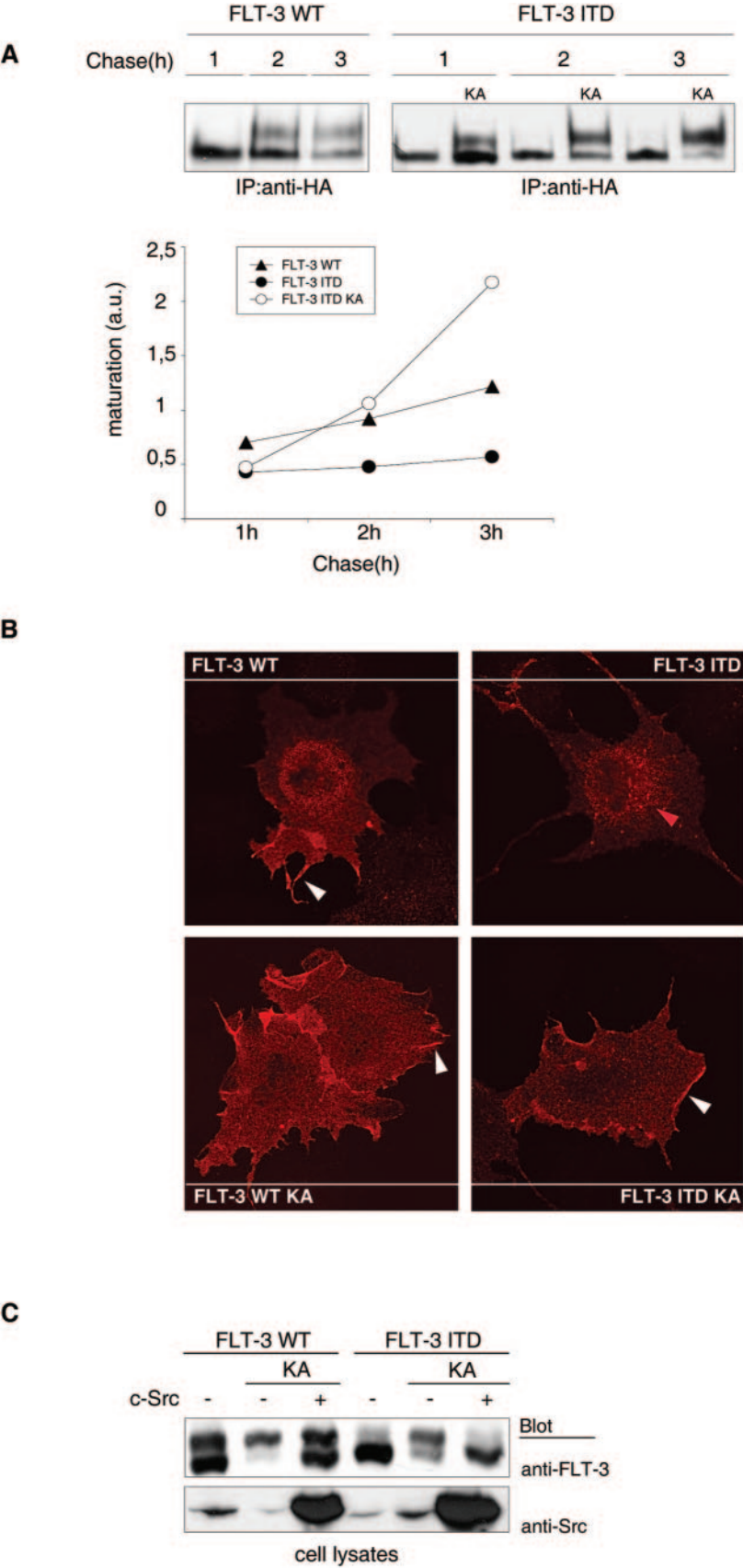
with endo-H, an enzyme which is highly specific for immature mannose-rich carbohydrates (Fig. 1D). Since mannose-rich glycoproteins are exclusively present in the ER, these biochemical observations provided further evidence that the FLT-3 130-kDa species resides in an ER compartment.

The glycosylation state of the 150-kDa form was analyzed by testing its reactivity with a set of lectins in both pull-down (Fig. 1E) and blotting (Fig. 2) assays. The 150-kDa form selectively interacted with SNA, RCA<sub>120</sub>, and SBA lectins, indicating the presence of terminal residues of sialic acid, galactose, and *N*-acetylgalactosamine, respectively, which are absent in the 130-kDa form. Selective reactivity of the 150-kDa form with lectins specific for these sugars was also derived from blotting experiments (Fig. 2). SNA lectin recognizes sialic acid preferentially in a form which is α-2,6-linked to subsequent galactose. Thus, SNA lectin reactivity indicates the presence of this terminal disaccharide. As shown before, GNA lectin in both pull-down and blotting assays reacted preferentially with the 130-kDa form. Interaction assays with UEA lectin revealed little reactivity, suggesting that neither of the FLT-3 variants contains significant amounts of fucose. DBA lectin is specific for *N*-acetylgalactosamine in an α-glycosidic linkage. The absence of reactivity with DBA lectin but the reactivity with SBA lectin therefore indicates that the terminal *N*-acetylgalactosamine residues are engaged in a β-glycosidic linkage. Treatment of FLT-3 immunoprecipitates from THP-1 cells with neuraminidase resulted in a clear size reduction of the 150-kDa form, further supporting the presence of significant amounts of sialic acid (Fig. 1F). Thus, the carbohydrate part of the 150-kDa form has features which are typical of complex glycosylated glycoproteins (9) and similar to those of oligosaccharide chains

in the cell surface epidermal growth factor receptor (45). A tentative structure is indicated in Fig. 2. Taken together, these results indicate that FLT-3 ITD exists in a much higher proportion than wild-type FLT-3 as an ER-bound, immature form containing mannose-rich carbohydrates. Conversely, wild-type FLT-3 exists predominantly as a 150-kDa form containing a larger proportion of carbohydrates with features typical of complex glycosylation.

To our surprise, treatment of cells with FLT-3 tyrosine kinase inhibitors, such as AG1296 or SU11248, resulted in the formation of larger amounts of the mature, 150-kDa form of FLT-3 ITD (Fig. 1G, upper panel). Similar data can be found in the literature (17, 34, 43) but have not received attention. Consistent with the effects of kinase inhibitors, the kinase-inactive FLT-3 K644A and FLT-3 ITD K644A mutants were present in the mature form in significantly larger amounts than their active counterparts (Fig. 1H). These findings indicated that FLT-3 kinase activity may impair efficient maturation. To directly test the effect of kinase activity on FLT-3 maturation, we performed pulse-chase experiments, comparing transiently expressed active FLT-3 ITD and wild-type FLT-3 with catalytically inactive FLT-3 ITD K644A. As shown in Fig. 3A, interconversion of the immature, 130-kDa species into the mature, 150-kDa species occurred rapidly for FLT-3 ITD K644A, whereas FLT-3 ITD very inefficiently matured within the observation time of 3 h. Wild-type FLT-3 matured better than FLT-3 ITD but clearly less efficiently than FLT-3 ITD K644A. Treatment of FLT-3 ITD-expressing MV4-11 cells with the FLT-3 kinase inhibitor SU11248 also led to much more efficient maturation in this assay (Fig. 1G, lower panel). Thus, kinase inactivation strongly promoted the maturation of FLT-3

FIG. 3. Tyrosine phosphorylation regulates FLT-3 maturation. (A) Proteins in COS-7 cells expressing wild-type (WT) FLT-3, FLT-3 ITD, or FLT-3 ITD K644A were metabolically labeled with [<sup>35</sup>S]methionine-[<sup>35</sup>S]cysteine for 20 min. An excess of unlabeled methionine-cysteine was added to the medium (chase). FLT-3 was immunoprecipitated (IP) at the indicated times and analyzed by SDS-PAGE and fluorography. The ratio of 150-kDa signals to 130-kDa signals was calculated in arbitrary units (a.u.). The graphic was compiled from four experiments with consistent results. (B) COS-7 cells expressing wild-type FLT-3, FLT-3 ITD, FLT-3 K644A, or FLT-3 ITD K644A were fixed and subjected to immunostaining with anti-FLT-3\* antibody and Cy3-labeled secondary antibody. Images were recorded with a confocal laser scanning microscope. White arrowheads indicate membrane localization; the red arrowhead indicates perinuclear staining. (C) FLT-3 variants were expressed alone or coexpressed with pp60<sup>c-src</sup> in HEK293 cells. Lysate aliquots were analyzed by immunoblotting. Apparent differences in endogenous c-Src levels reflect loading differences and were not the result of FLT-3 expression.



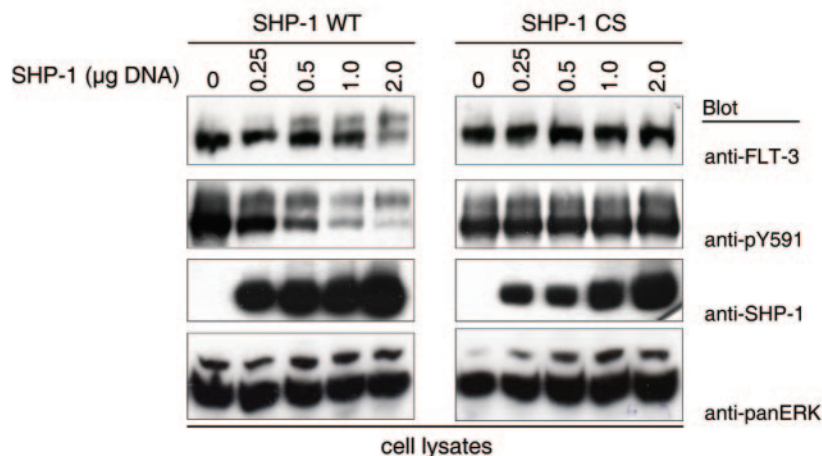
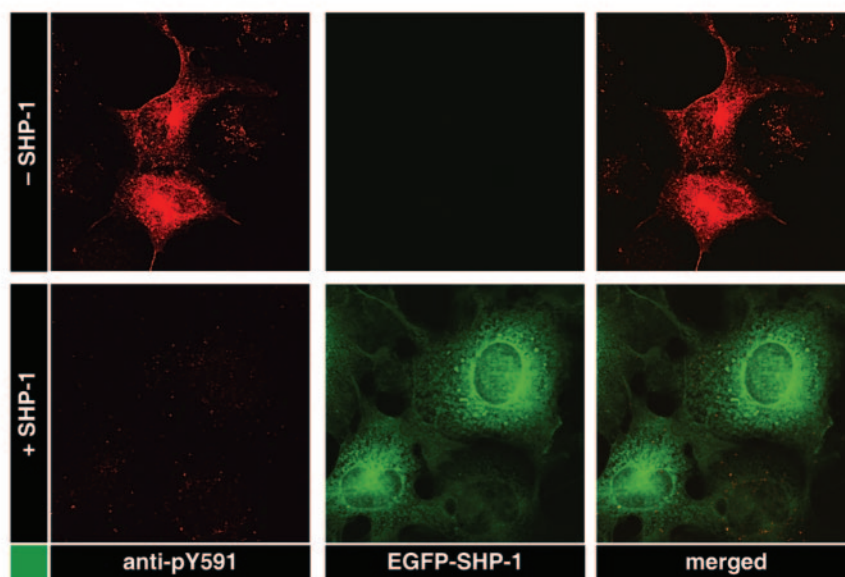
**A****B**

FIG. 4. PTPs promote FLT-3 maturation. (A) FLT-3 ITD was transiently coexpressed with various amounts of wild-type (WT) PTP SHP-1 or the catalytically inactive SHP-1 CS variant. Lysate aliquots were analyzed by immunoblotting. (B) COS-7 cells were transfected with expression constructs for FLT-3 ITD alone or together with EGFP-tagged SHP-1. Phosphorylated FLT-3 was detected by immunostaining with anti-pY591 antibody and Cy3-labeled secondary antibody. The expression of SHP-1 was monitored by EGFP fluorescence. (C) FLT-3 ITD was expressed in the absence or in the presence of SHP-1 in COS-7 cells, and the cells were metabolically labeled with [ $^{35}$ S]methionine-[ $^{35}$ S]cysteine. Maturation of FLT-3 was analyzed in a pulse-chase experiment as described in the legend to Fig. 3A. IP, immunoprecipitation. (D) VSV-G was expressed in HEK293 cells either alone or in the presence of FLT-3 ITD, FLT-3 ITD KA, or SHP-1. VSV-G was immunoprecipitated and either mock treated or digested with endo-H. Digestion products were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with anti-VSV antibodies. Immature, ER-localized VSV-G species are indicated by the appearance of a lower-molecular-weight band after endo-H digestion (EndoH sens.). Mature VSV-G remains resistant to endo-H (EndoH resist.). (E) EGFP-tagged FLT-3 ITD was coexpressed either with an ECFP-tagged Golgi compartment marker or with an ECFP-tagged ER marker alone or in the presence of SHP-1 in COS-7 cells. Localization of FLT-3 ITD was detected by EGFP fluorescence and compared to the ECFP fluorescence of the indicated localization markers. The expression of SHP-1 was monitored by immunostaining with anti-SHP-1 antibody and Cy3-labeled secondary antibody. Images were recorded with a confocal laser scanning microscope. White arrowheads indicate membrane localization; red arrowheads indicate perinuclear staining. (F) FLT-3 ITD was transiently coexpressed with various amounts of PTP1B or PTP-PEST in HEK293 cells. Lysate aliquots were analyzed by immunoblotting. (G) COS-7 cells were transfected with wild-type FLT-3 and preincubated either with proteasome inhibitor MG132 (lower panels) or with the corresponding solvent (upper panels). The broad-range PTP inhibitor bp(V)phen was added, and incubation was continued for the indicated times. Lysate aliquots were analyzed with the indicated antibodies. (H) THP-1 cells expressing wild-type FLT-3 endogenously were subjected to treatment with bp(V)phen as described for panel G. FLT-3 was immunoprecipitated, and expression was analyzed by immunoblotting. (I) COS-7 cells were transfected with an expression construct for wild-type FLT-3 or FLT-3 ITD and treated with brefeldin A for 6 h. Lysate aliquots were analyzed by immunoblotting. (J) (Left panels) HEK293 cells were transfected with wild-type FLT-3 and cotransfected with a pSuper PTP1B siRNA expression construct or the corresponding vector. Immunoblots of lysate aliquots are shown. (Right panels) THP-1 cells stably transduced either with empty pSuper.retro plasmid or with a pSuper.retro.puro SHP-1 siRNA expression construct were transfected with PTP1B siRNAs by using Amaxa electroporation. FLT-3 was immunoprecipitated, and expression was analyzed by immunoblotting. Lysate aliquots were analyzed by immunoblotting for the suppression of PTP1B and SHP-1. Relative expression levels were determined by densitometric analysis and are indicated below the blots (control, 1.0).



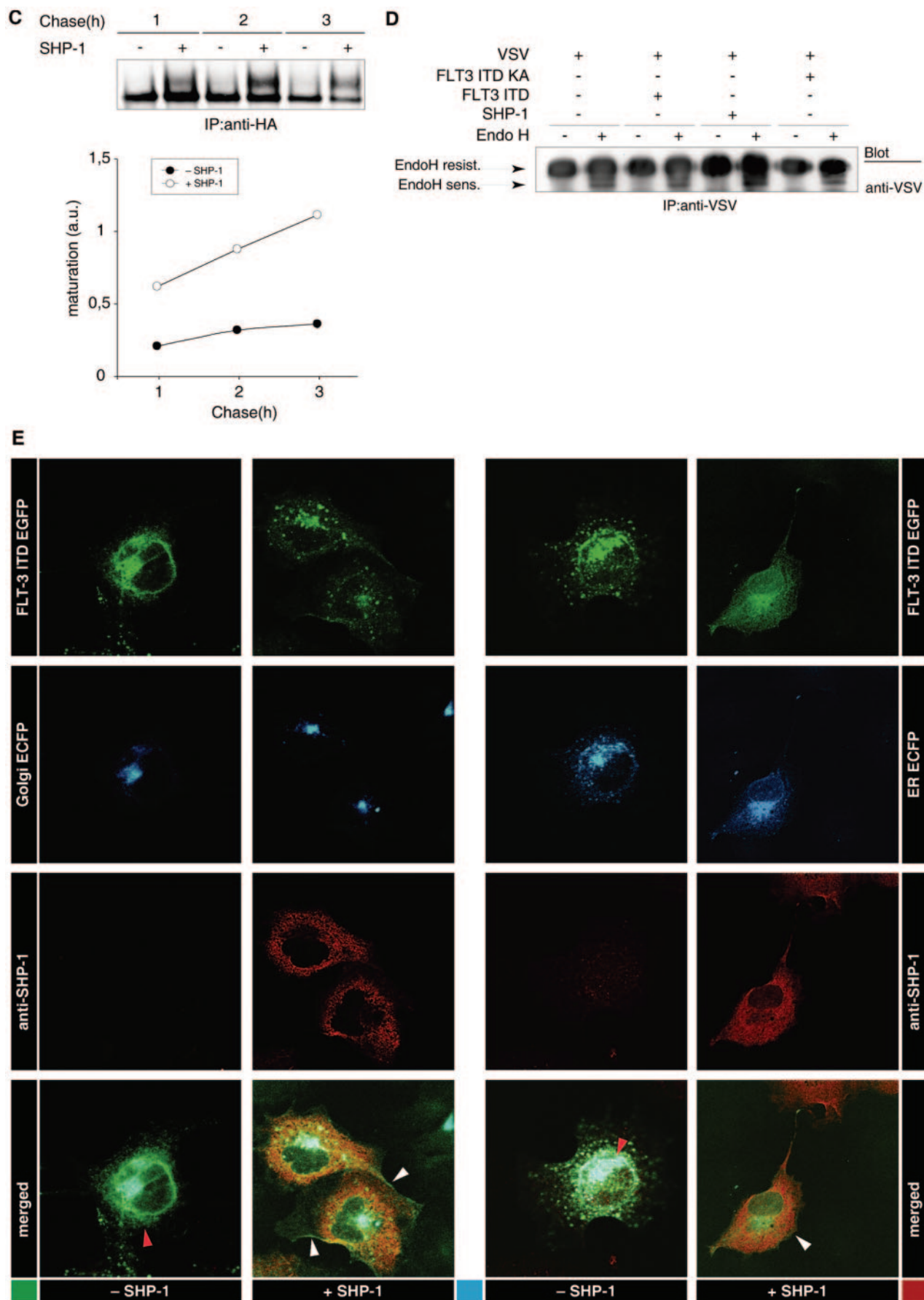


FIG. 4—Continued.

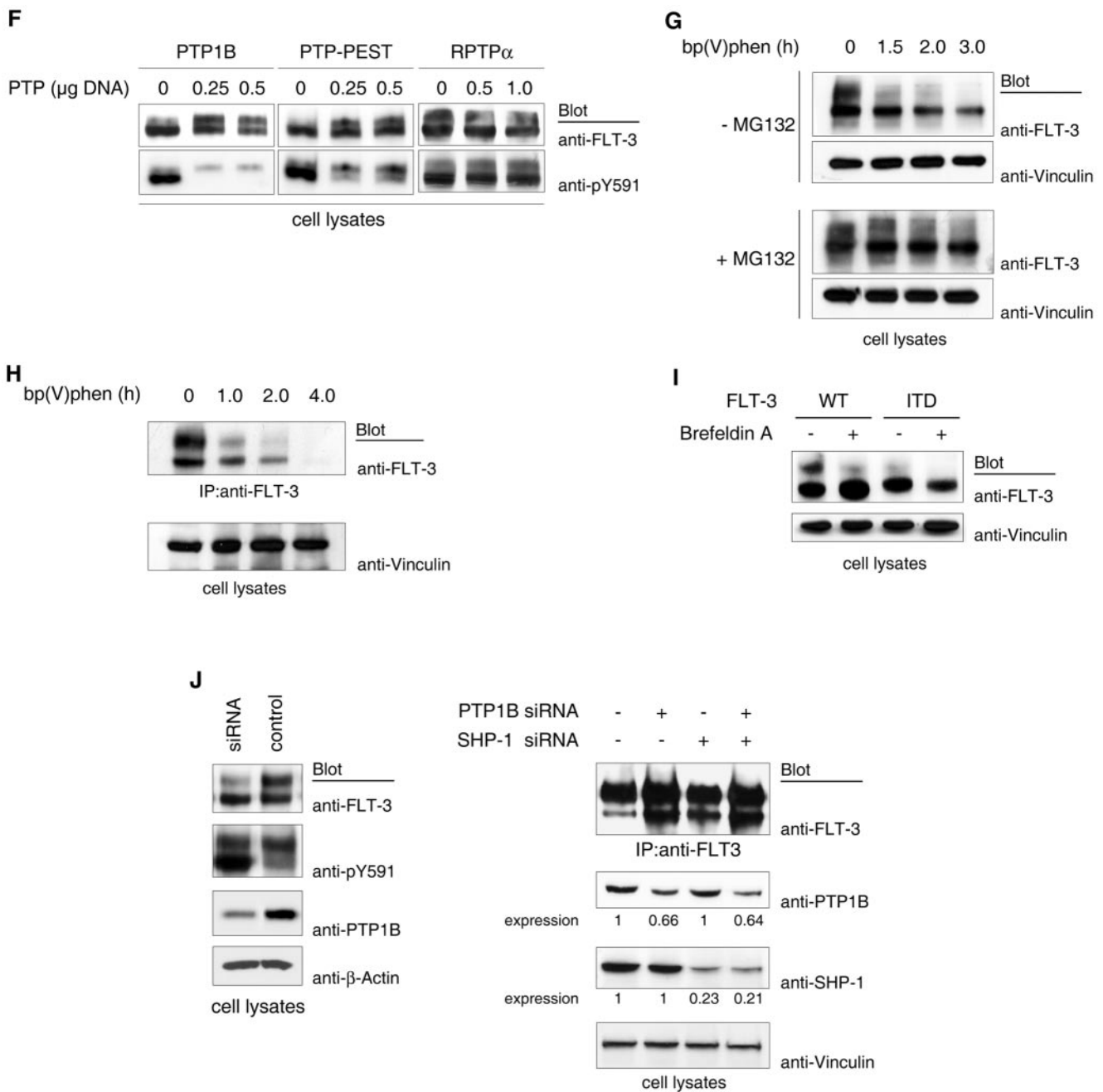


FIG. 4—Continued.

ITD. Confirming previous observations for wild-type FLT-3 (21), these data also show that the 130-kDa species gives rise to the 150-kDa species and exclude the possibility that the 130-kDa species is a degradation product of the 150-kDa species. Further, they exclude the possibility that the low cellular levels of the 150-kDa species in cells expressing active FLT-3 ITD are the consequence of correct formation but subsequent rapid degradation. Consistent with improved maturation, both FLT-3 K644A and FLT-3 ITD K644A were localized to a much larger extent at the surface of transfected cells than were the kinase-active receptors (Fig. 3B).

Src family kinases cooperate with a number of RTKs in signal generation and have the capacity to phosphorylate RTKs with a selectivity overlapping that of autophosphorylation (8, 40). We therefore wondered whether the phosphorylation of kinase-inactive FLT-3 K644A by a Src family kinase would occur and would have an effect on maturation. Interestingly, the coexpression of pp60<sup>c-src</sup> resulted in FLT-3 tyrosine phosphorylation (data not shown) and strongly impaired the maturation of the kinase-inactive KA mutants of wild-type FLT-3 and FLT-3 ITD (Fig. 3C). Thus, tyrosine phosphorylation of the kinase-deficient receptors themselves or of other cellular

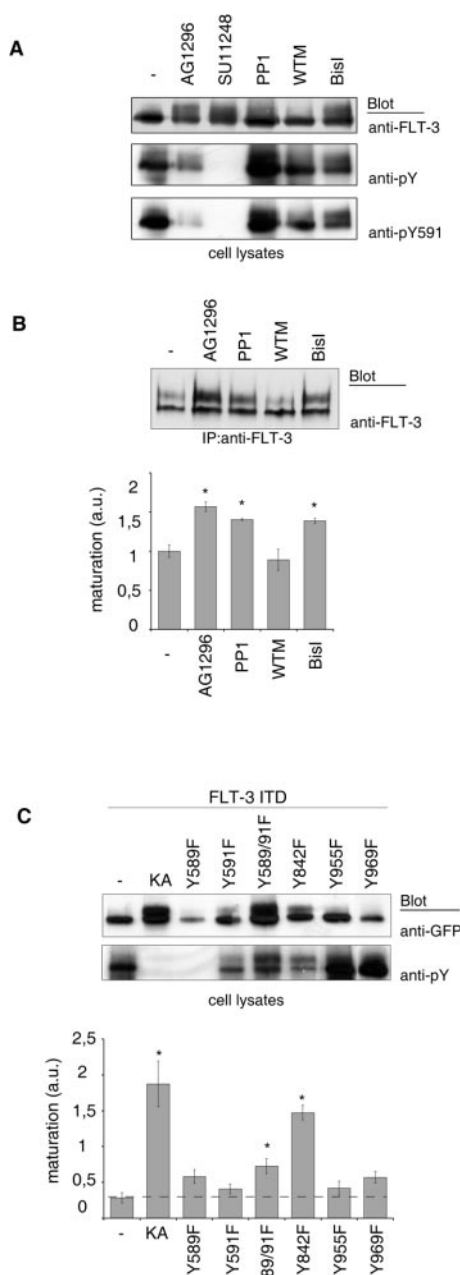


FIG. 5. Roles of signal transduction and of individual phosphorylation sites in FLT-3 maturation. FLT-3 ITD-expressing COS-7 cells (A) or MV4-11 cells (B) were treated with the FLT-3 tyrosine kinase inhibitor AG1296 or SU11248, the Src family kinase inhibitor PP1, the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin (WTM), or the PKC family inhibitor BisI for 3 h. FLT-3 expression was analyzed by immunoblotting of lysate aliquots (A) or of FLT-3 immunoprecipitates (IP) (B, upper panel). The results of three experiments with MV4-11 cells were quantitated and are shown in the lower panel (mean  $\pm$  SEM; the asterisk indicates a  $P$  value of  $<0.05$ ). a.u., arbitrary units. (C) The indicated mutants of EGFP-tagged FLT-3 ITD were expressed in COS-7 cells. Expression and phosphorylation were evaluated by immunoblotting of lysate aliquots; representative results are shown in the upper panels. The results of three or four independent experiments were quantitated by densitometric scanning, and maturation was calculated as the ratio of 150-kDa signals to 130-kDa signals; the results are shown in the lower panel (mean  $\pm$  SEM; the asterisk indicates a  $P$  value of  $<0.05$ ). The broken horizontal line indicates the control level of maturation, for better comparison.

substrates by a heterologous kinase could complement defective FLT-3 kinase activity and still result in a maturation block.

**PTPs promote and enable FLT-3 maturation.** To further establish a relationship of FLT-3 maturation with tyrosine phosphorylation, we explored the possible effects of PTPs. The overexpression of SHP-1, a PTP that is expressed in all hematopoietic lineages (44), resulted in the dephosphorylation of FLT-3 ITD (Fig. 4A and B) and in elevated levels of mature, 150-kDa FLT-3 ITD (Fig. 4A). Both effects were dependent on PTP activity and were not observed with catalytically inactive SHP-1 C455S (Fig. 4A). The 150-kDa form was less efficiently dephosphorylated in these experiments, probably indicating that this form has a localization different from that of SHP-1. The promoting effect of SHP-1 on FLT-3 ITD maturation could also be observed in pulse-chase experiments (Fig. 4C). To explore whether PTP expression has a general effect on cellular glycoprotein maturation, we analyzed the effect of SHP-1 expression on the maturation of VSV-G. VSV-G was previously used to study glycoprotein maturation (23). Since the size difference between mature VSV-G and immature VSV-G is very small, the presence of the immature form can be better assessed by analyzing endo-H sensitivity. In this type of analysis, neither the coexpression of SHP-1 nor that of FLT-3 ITD affected the maturation of VSV-G (Fig. 4D), indicating that both have no general influence on the maturation machinery.

We also analyzed the effect of SHP-1 coexpression on the cellular localization of FLT-3 ITD. In the absence of SHP-1, EGFP-tagged FLT-3 ITD showed a perinuclear localization, largely overlapping the localization of a coexpressed ECFP-tagged ER marker but only partially overlapping the localization of a corresponding Golgi compartment marker. Coexpression of SHP-1 led to a change in FLT-3 ITD localization, with reduced amounts in the perinuclear compartment and elevated amounts in the cell periphery, including the plasma membrane (Fig. 4E). To evaluate the specificity of the SHP-1 effect, we tested additional PTPs for their influence on FLT-3 ITD maturation. PTP1B and, to a lesser extent, PTP-PEST dephosphorylated FLT-3 ITD and promoted its maturation, whereas RPTP $\alpha$  neither dephosphorylated the receptor nor had an effect on its maturation (Fig. 4F). Thus, not all PTPs can promote maturation, and the effect correlates with the capacity of a PTP to dephosphorylate FLT-3. Conversely, the general inhibition of cellular PTPs by the cell-permeating PTP inhibitor bp(V)phen strongly compromised the maturation of wild-type FLT-3 (Fig. 4G and H). At longer treatment times, FLT-3 protein was lost. In the presence of the proteasome inhibitor MG132, the bp(V)phen-induced loss of FLT-3 was attenuated to some extent (Fig. 4G, lower panel), suggesting that the massive block of FLT-3 maturation upon general PTP inhibition eventually triggered proteasome-mediated degradation. Thus, general PTP inhibition had an effect on FLT-3 maturation similar to the general blockade of transport from the ER to the Golgi compartment by brefeldin A (Fig. 4I).

To address more specifically the role of PTPs in maturation, we chose to perform siRNA-mediated suppression of two PTPs. PTP1B is anchored to ER membranes via a C-terminal targeting sequence and may control the phosphorylation status of newly synthesized RTKs (5). Transfection of HEK293 cells with an expression vector directing the synthesis of an siRNA

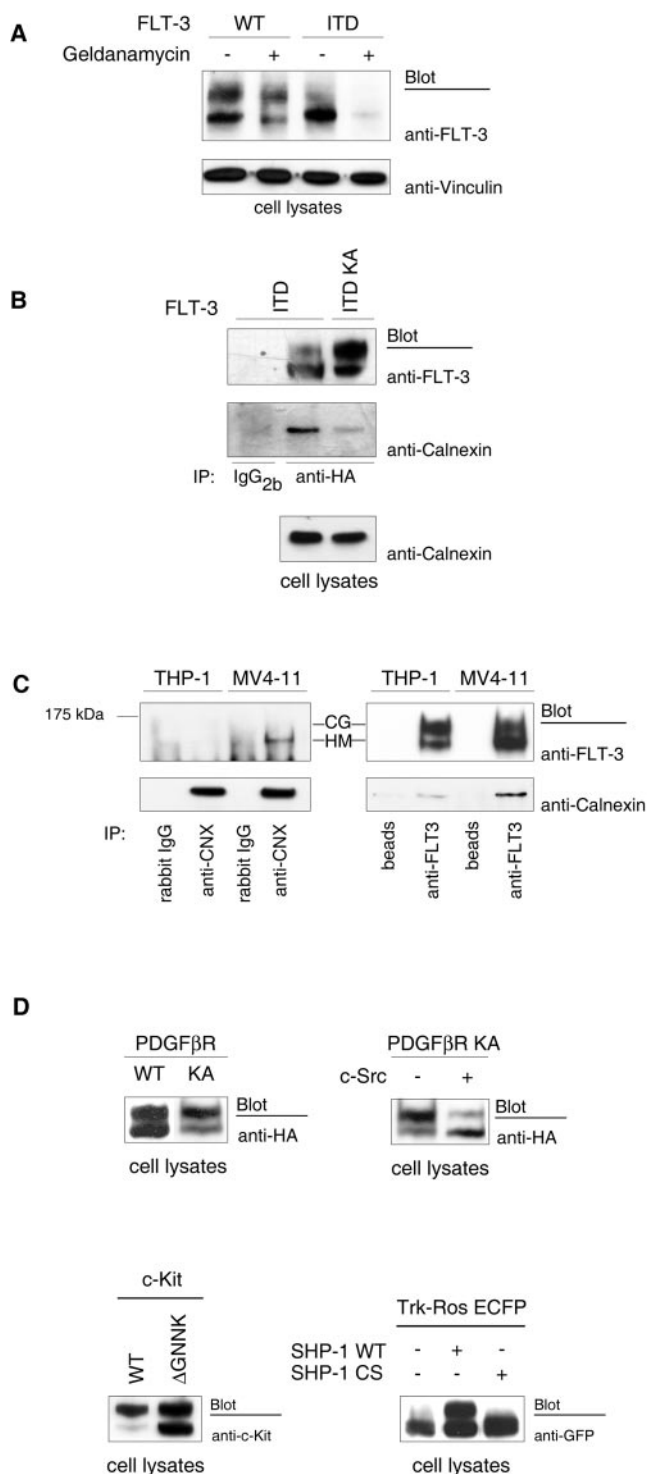


FIG. 6. Impaired stability of FLT-3 ITD, enhanced association with the ER chaperone calnexin, and generality of phosphorylation-dependent RTK maturation. (A) COS-7 cells were transfected with expression constructs for wild-type (WT) FLT-3 or FLT-3 ITD and treated with the Hsp90 inhibitor geldanamycin for 6 h. The expression of FLT-3 was detected by immunoblotting of lysate aliquots. (B) FLT-3 ITD or its kinase-inactive FLT-3 ITD K644A counterpart was expressed in COS-7 cells. FLT-3 was immunoprecipitated (IP), and the immunoprecipitates were probed for associated calnexin. Lysate aliquots were analyzed by immunoblotting for equal levels of expression

which specifically targets human PTP1B mRNA reduced the expression of endogenous PTP1B by at least 80% (Fig. 4J, left panel). Transiently expressed wild-type FLT-3 clearly matured less efficiently in these cells than in the corresponding control cells. Thus, endogenous PTP1B was limiting for efficient FLT-3 maturation in this setting. Interestingly, the suppression of PTP1B was also associated with hyperphosphorylation of the immature, 130-kDa form of FLT-3 (Fig. 4J, left panel). In an attempt to suppress PTP1B expression in THP-1 cells, we succeeded only in a mild reduction in protein levels (by 35%) compared to the results in mock-treated cells. Still, less efficient maturation of endogenous wild-type FLT-3 could clearly be detected (Fig. 4J, right panel). On the other hand, efficient reduction of endogenous SHP-1 expression had only a rather weak effect on maturation (Fig. 4J, right panel); however, this finding was consistently seen in many experiments. This analysis, which needs to be extended to additional PTPs, indicates the differential importance of endogenous PTPs for FLT-3 maturation.

**Reduced folding efficiency causes ER retention of FLT-3 ITD.** To explore the mechanism leading to the retarded maturation of FLT-3 ITD, we first considered that its constitutive signaling activity could inhibit components that are important for ER-Golgi compartment translocation and/or complex glycosylation. If this were the case, then it should be possible to assign the maturation block to a selective downstream signaling event. We first tested several inhibitors of signaling pathways which are known to be activated by FLT-3 ITD (for a review, see reference 35). Among them, the protein kinase C (PKC) family inhibitor BisI and the Src family kinase inhibitor PP1 reproducibly but only weakly promoted maturation, whereas the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin had no effect (Fig. 5A and B).

Taking an alternative approach, we generated point mutations in individual FLT-3 autophosphorylation sites and tested the mutants for maturation efficiency. If selective signaling events were important, then maturation should be enhanced by mutation of the corresponding binding sites of respective signaling molecules. This analysis revealed differential effects of the YF point mutations (Fig. 5C). Single mutations of tyrosines 589, 591, 955, and 969 had little promoting effect on maturation. The Y589F mutation strongly reduced expression for unknown reasons. Clear promotion of maturation occurred with mutation of tyrosine 842, which resides in the FLT-3 kinase activation loop. By analogy with related RTKs, phosphorylation of this site should be important for kinase activa-

tion of calnexin. (C) MV4-11 or THP-1 cells were used to analyze calnexin (CNX) association with endogenous FLT-3 ITD or wild-type FLT-3, respectively. Either FLT-3 was detected in calnexin immunoprecipitates (left panels) or FLT-3 was immunoprecipitated and probed for associated calnexin (right panels). CG, complex glycosylated species; HM, high-mannose form. (D) The following proteins were expressed in HEK293 cells: PDGFR (PDGFR), its kinase-inactive KA version (alone or in the presence of pp60<sup>src</sup> kinase), wild-type c-Kit, Kit <sup>$\Delta$ GNNK</sup>, or Trk-Ros-ECFP (a chimeric receptor containing the extracellular domain of human TrkA and the intracellular domain of mouse c-Ros and tagged with ECFP) (alone or in combination with wild-type [WT] SHP-1 or its CS variant). Corresponding cell lysates were analyzed by immunoblotting.



tion (11). Indeed, the FLT-3 ITD Y842F molecule exhibited reduced general phosphorylation. Thus, this mutation did not selectively affect signaling but rather impaired global phosphorylation. The promoted maturation of FLT-3 ITD Y842F was therefore consistent with the effects of kinase inhibitors, K644A mutations, or dephosphorylation by PTPs described above. The combined mutation of tyrosines 589 and 591 had no significant effect on kinase activity, global phosphorylation, or expression level but still reproducibly enhanced maturation weakly, suggesting that these mutations may inhibit a signaling activity of FLT-3 ITD which negatively regulates maturation. By analogy with homologous platelet-derived growth factor (PDGF) receptors and the RTK c-Kit (19, 27), one candidate signaling molecule for binding to these sites is pp60<sup>c-src</sup>, consistent with the maturation-promoting effect of a Src family kinase inhibitor. Thus, selective signaling events downstream of active FLT-3, notably, Src family kinases, may play some role in the attenuation of the maturation process. However, global FLT-3 phosphorylation appeared to be the dominant factor for retarded maturation. These findings also suggest that it is not the kinase activity of FLT-3 ITD toward other substrates but rather the constitutive phosphorylation of the molecule itself that may primarily cause impaired maturation.

As an obvious possible reason for the inefficient maturation of FLT-3 ITD independent from signaling processes, we considered the inefficient folding of the autophosphorylated kinase. A reduced folding capacity should lead to an enhanced interaction with ER-resident chaperones in the process of ER quality control. The observed ER retention of FLT-3 ITD would be consistent with such a model. An enhanced chaperone dependence of FLT-3 ITD was previously suggested. FLT-3 ITD but not wild-type FLT-3 was shown to associate with heat shock protein 90 (Hsp90), and its activity and expression were dependent on this association (24). In support of this observation, we found that geldanamycin, an inhibitor of Hsp90 function, potently reduced the level of expression of FLT-3 ITD, whereas wild-type FLT-3 was affected to a much lesser extent (Fig. 6A). While this article was in preparation, similar findings were reported by others (7). We therefore tested whether FLT-3 ITD would exhibit an enhanced interaction with the ER chaperone calnexin, a key component of the ER quality control mechanism for glycoproteins (4). FLT-3 ITD indeed associated with calnexin, whereas wild-type FLT-3 and the kinase-inactive FLT-3 ITD K644A mutant interacted with calnexin much less efficiently (Fig. 6B and C). Thus, constitutive phosphorylation of FLT-3 ITD appears to result in inefficient folding, indicated by chaperone dependence and enhanced recognition by the ER quality control system.

**Inverse relationship of maturation efficiency and tyrosine phosphorylation for other RTKs.** To explore whether the inverse relationship of RTK phosphorylation and maturation obeys a more common mechanism, we analyzed additional members of the RTK family. For the PDGF $\beta$  receptor, expression of the kinase-inactive K634A mutant led to the formation of more mature receptor than expression of the wild type (Fig. 6D). However, coexpression of pp60<sup>c-src</sup> with the kinase-inactive receptor resulted in the accumulation of an immature receptor, similar to what was observed before for FLT-3. In a comparison of wild-type c-Kit with its constitutively active counterpart c-Kit <sup>$\Delta$ GNNK</sup> (30), it was evident that wild-type

c-Kit matured properly, while c-Kit <sup>$\Delta$ GNNK</sup> existed to a considerable extent in an immature, underglycosylated form (Fig. 6D). Finally, the structurally less related RTK c-Ros also yielded mature and underglycosylated forms upon overexpression. Coexpression with the potent PTP SHP-1 (15) strongly promoted maturation (Fig. 6D). Thus, the regulation of RTK maturation by tyrosine phosphorylation appears to be a more general phenomenon and is not restricted to FLT-3.

## DISCUSSION

Mutations in membrane molecules which impair expression at the cell surface have been found in different diseases (32). Examples are loss-of-function mutations in the extracellular domain of the RTK RET, which are associated with Hirschsprung disease. In this condition, immature forms of mutant RET protein accumulate intracellularly and are prevented from interaction with the coreceptor GFR $\alpha$ 1 and the ligand GDNF (16). Similar observations have been reported for the insulin receptor in certain rare cases of insulin-resistant diabetes (31). As a common principle, these disease-causing mutations impair the folding efficiency of the kinases, leading to entrapment by the chaperones that are components of the ER quality control. Another class of mutations which lead to proteins with pronounced chaperone interactions are gain-of-function mutations in oncogenic kinases. Such proteins, for example, BCR-Abl, v-Src, and mutated Kit, are dependent on continuous interactions with the chaperone Hsp90, as indicated by their rapid degradation in the presence of the Hsp90-depleting agent geldanamycin or its analogs (12).

As we describe here, the transforming RTK FLT-3 ITD interacts with both classes of chaperones, indicating inefficient folding and stability. An enhanced interaction with calnexin in the ER is associated with partial ER retention and reduced surface expression. As a previously unrecognized phenomenon, ER retention of FLT-3 ITD is linked to its constitutive kinase activity and can be overcome by kinase-inactivating mutations, treatment with kinase inhibitors, or coexpression of PTPs. A negative regulatory function of tyrosine phosphorylation for RTK maturation is most likely a more general mechanism, since we observed it also for three other tested members of the RTK family—c-Kit, the PDGF $\beta$  receptor, and Ros. While this article was in preparation, Lievens et al. (18) reported that highly activated mutant versions of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR-3), which cause a severe form of dwarfism in men, mature very inefficiently. Kinase inactivation, however, restores maturation and surface localization. These findings are consistent with the observations that we report here and support the generality of an inhibitory role of tyrosine phosphorylation in the maturation of RTKs.

For the mechanism of maturation arrest, we considered the possibility that signaling downstream of constitutively active FLT-3 ITD negatively regulates components that participate in the maturation process, for example, molecules of the quality control mechanism or molecules with importance for ER-Golgi vesicle transport. We observed, however, no clear effects of FLT-3 ITD expression on the maturation of VSV-G. Thus, signaling of FLT-3 ITD was obviously without prominent effects on the general glycoprotein maturation machinery. Attempts to link the constitutive signaling activity of FLT-3 ITD

with ER retention by testing a panel of signal transduction inhibitors and a panel of YF mutants likewise revealed no clue for a critical signaling event. We observed some weak maturation-promoting effects of the PKC inhibitor BisI, the Src family inhibitor PP1, and a Y589/591F double mutation, which may also be related to impaired interactions with Src family kinases. These potential pathways for the regulation of ER quality control or further steps in FLT-3 maturation deserve further investigation. However, complete inactivity or global dephosphorylation of FLT-3 ITD showed the best correlation with maturation, suggesting that it may be phosphorylation of the RTK itself which reduces folding efficiency and triggers the calnexin interaction. Again, this activity could not be linked to phosphorylation of single sites in our mutational analysis. Instead, the physicochemical effect of phosphorylation on multiple sites may impair folding and potentially also protein stability. Answering these questions will require folding experiments at the level of recombinant FLT-3 protein.

Our findings suggest a novel function for ER-associated PTPs. General PTP inhibition drastically impaired the maturation of wild-type FLT-3 to the point that degradation was initiated. Based on our results, we propose that suppression of the basal activities of newly synthesized RTKs is essential for their release from ER quality control and further processing. Analysis of individual PTPs for their roles in this process is highly warranted. It should be noted that several PTPs have ER localization domains (PTP1B and T-cell PTP) (5, 20) or are enriched in a perinuclear compartment (SHP-1) (37). A role for PTP1B in suppressing the activities of ER-bound RTKs was proposed earlier but has not been linked to RTK maturation (6). A function of PTP1B in this process is supported by our finding of impaired FLT-3 maturation upon siRNA-mediated suppression of endogenous PTP1B expression in HEK293 cells transiently expressing wild-type FLT-3. Also, siRNA-mediated partial reduction of endogenous PTP1B levels in THP-1 cells led to less efficient maturation of endogenous wild-type FLT-3. However, the suppression of SHP-1 had only a weak effect on endogenous FLT-3 maturation, suggesting differential importance of the two PTPs in this process. Further experiments are required to firmly establish the role of PTP1B and to evaluate the role of other PTP family members.

Another interesting implication from our study is the possibility that ER retention of constitutively active RTKs changes the quality of signal transduction by providing access to substrates which are not accessible to surface-bound RTKs. This may be an important aspect of the transforming activities of constitutively active RTKs. Indeed, there are strong qualitative differences in the signaling of FLT-3 ITD compared with ligand-stimulated wild-type FLT-3 which presently cannot be explained (26). ER-retained, constitutively active versions of FGFR-3 are capable of activating the Janus kinase (Jak)/STAT pathway by directly recruiting Jak1, whereas wild-type FGFR-3 cannot activate STAT1 (18). For the RTK Ros, it has been shown that aberrant Golgi compartment localization in glioblastoma cells, conferred by fusion with the Golgi compartment-targeted partner FIG, is transforming (3). Intracellular activation of PDGF receptors by the v-Sis protein has been related to *sis*-mediated transformation (1, 13). Thus, ER or Golgi compartment retention may emerge as a more general

pathway for RTK-mediated pathological signaling and transformation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to S. Scholl for providing THP-1 and MV4-11 cells as well as for help with FACS analysis. We thank W. Birchmeier, L. Claesson-Welsh, D. Fujita, S. Gutkind, C. H. Heldin, L. Rönnstrand, M. Tremblay, and A. Ullrich for providing various cDNAs and H. Keilhack, M. O'Farrel, and G. Nolan for providing other reagents and tools.

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB604, A1, and Bo 1043/4-3 to F.-D.B. and Se600/2-3 to H.S.), from the Deutsche Krebshilfe (10-2100-Do2 to F.-D.B.), and from the IZKF Münster (to H.S.).

#### REFERENCES

- Bejcek, B. E., D. Y. Li, and T. F. Deuel. 1989. Transformation by v-sis occurs by an internal autoactivation mechanism. *Science* **245**:1496–1499.
- Brummelkamp, T. R., R. Bernards, and R. Agami. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**:550–553.
- Charest, A., V. Kheifets, J. Park, K. Lane, K. McMahon, C. L. Nutt, and D. Housman. 2003. Oncogenic targeting of an activated tyrosine kinase to the Golgi apparatus in a glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:916–921.
- Ellgaard, L., and A. Helenius. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:181–191.
- Frangioni, J. V., P. H. Beahm, V. Shifrin, C. A. Jost, and B. G. Neel. 1992. The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. *Cell* **68**:545–560.
- Frangioni, J. V., A. Oda, M. Smith, E. W. Salzman, and B. G. Neel. 1993. Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets. *EMBO J.* **12**:4843–4856.
- George, P., P. Bali, P. Cohen, J. Tao, F. Guo, C. Sigua, A. Vishvanath, W. Fiskus, A. Scuto, S. Annamavaru, L. Moscinski, and K. Bhalla. 2004. Cotreatment with 17-allylamino-demethoxygeldanamycin and FLT-3 kinase inhibitor PKC412 is highly effective against human acute myelogenous leukemia cells with mutant FLT-3. *Cancer Res.* **64**:3645–3652.
- Hansen, K., M. Johnell, A. Siegbahn, C. Rorsman, U. Engström, C. Wernstedt, C. H. Heldin, and L. Rönnstrand. 1996. Mutation of a Src phosphorylation site in the PDGF beta-receptor leads to increased PDGF-stimulated chemotaxis but decreased mitogenesis. *EMBO J.* **15**:5299–5313.
- Helenius, A., and M. Aebi. 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**:2364–2369.
- Helenius, A., and M. Aebi. 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **73**:1019–1049.
- Hubbard, S. R. 2002. Autoinhibitory mechanisms in receptor tyrosine kinases. *Front. Biosci.* **7**:d330–d340.
- Kamal, A., M. F. Boehm, and F. J. Burrows. 2004. Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. *Trends Mol. Med.* **10**:283–290.
- Keating, M. T., and L. T. Williams. 1988. Autocrine stimulation of intracellular PDGF receptors in v-sis-transformed cells. *Science* **239**:914–916.
- Keilhack, H., U. Hellman, J. van Hengel, F. van Roy, J. Godovac-Zimmermann, and F. D. Böhmer. 2000. The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 binds to and dephosphorylates p120 catenin. *J. Biol. Chem.* **275**:26376–26384.
- Keilhack, H., M. Müller, S. A. Böhmer, C. Frank, K. M. Weidner, W. Birchmeier, T. Ligensa, A. Berndt, H. Kosmehl, B. Günther, T. Müller, C. Birchmeier, and F. D. Böhmer. 2001. Negative regulation of Ros receptor tyrosine kinase signaling. An epithelial function of the SH2 domain protein tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Cell Biol.* **152**:325–334.
- Kjaer, S., and C. F. Ibanez. 2003. Intrinsic susceptibility to misfolding of a hot-spot for Hirschsprung disease mutations in the ectodomain of RET. *Hum. Mol. Genet.* **12**:2133–2144.
- Levis, M., J. Allebach, K. F. Tse, R. Zheng, B. R. Baldwin, B. D. Smith, S. Jones-Bolin, B. Ruggeri, C. Dionne, and D. Small. 2002. A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* **99**:3885–3891.
- Lieven, P. M., C. Mutinelli, D. Baynes, and E. Liboi. 2004. The kinase activity of fibroblast growth factor receptor 3 with activation loop mutations affects receptor trafficking and signaling. *J. Biol. Chem.* **279**:43254–43260.
- Linnekin, D., C. S. DeBerry, and S. Mou. 1997. Lyn associates with the juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells. *J. Biol. Chem.* **272**:27450–27455.
- Lorenzen, J. A., C. Y. Dadabay, and E. H. Fischer. 1995. COOH-terminal sequence motifs target the T cell protein tyrosine phosphatase to the ER and nucleus. *J. Cell Biol.* **131**:631–643.

21. Lyman, S. D., L. James, J. Zappone, P. R. Sleath, M. P. Beckmann, and T. Bird. 1993. Characterization of the protein encoded by the flt3 (flk2) receptor-like tyrosine kinase gene. *Oncogene* **8**:815–822.
22. Matthews, W., C. T. Jordan, G. W. Wiegand, D. Pardoll, and I. R. Lemischka. 1991. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* **65**:1143–1152.
23. Mezzacasa, A., and A. Helenius. 2002. The transitional ER defines a boundary for quality control in the secretion of tsO45 VSV glycoprotein. *Traffic* **3**:833–849.
24. Minami, Y., H. Kiyoi, Y. Yamamoto, K. Yamamoto, R. Ueda, H. Saito, and T. Naoe. 2002. Selective apoptosis of tandemly duplicated FLT3-transformed leukemia cells by Hsp90 inhibitors. *Leukemia* **16**:1535–1540.
25. Mizuki, M., R. Fenski, H. Halfter, I. Matsumura, R. Schmidt, C. Müller, W. Gruning, K. Kratz-Albers, S. Serve, C. Steur, T. Buchner, J. Kienast, Y. Kanakura, W. E. Berdel, and H. Serve. 2000. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* **96**:3907–3914.
26. Mizuki, M., J. Schwable, C. Steur, C. Choudhary, S. Agrawal, B. Sargin, B. Steffen, I. Matsumura, Y. Kanakura, F. D. Böhmer, C. Muller-Tidow, W. E. Berdel, and H. Serve. 2003. Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood* **101**:3164–3173.
27. Mori, S., L. Rönnstrand, K. Yokote, A. Engstrom, S. A. Courtneidge, L. Claesson-Welsh, and C. H. Heldin. 1993. Identification of two juxtamembrane autophosphorylation sites in the PDGF beta-receptor; involvement in the interaction with Src family tyrosine kinases. *EMBO J.* **12**:2257–2264.
28. Nakao, M., S. Yokota, T. Iwai, H. Kaneko, S. Horiike, K. Kashima, Y. Sonoda, T. Fujimoto, and S. Misawa. 1996. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **10**:1911–1918.
29. O'Farrell, A. M., T. J. Abrams, H. A. Yuen, T. J. Ngai, S. G. Louie, K. W. Yee, L. M. Wong, W. Hong, L. B. Lee, A. Town, B. D. Smolich, W. C. Manning, L. J. Murray, M. C. Heinrich, and J. M. Cherrington. 2003. SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood* **101**:3597–3605.
30. Reith, A. D., C. Ellis, S. D. Lyman, D. M. Anderson, D. E. Williams, A. Bernstein, and T. Pawson. 1991. Signal transduction by normal isoforms and W mutant variants of the Kit receptor tyrosine kinase. *EMBO J.* **10**:2451–2459.
31. Rouard, M., J. Bass, F. Grigorescu, T. P. Garrett, C. W. Ward, G. Lipkind, C. Jaffiole, D. F. Steiner, and G. I. Bell. 1999. Congenital insulin resistance associated with a conformational alteration in a conserved beta-sheet in the insulin receptor L1 domain. *J. Biol. Chem.* **274**:18487–18491.
32. Sanders, C. R., and J. K. Myers. 2004. Disease-related misassembly of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33**:25–51.
33. Sawyers, C. L. 2002. Finding the next Gleevec: FLT3 targeted kinase inhibitor therapy for acute myeloid leukemia. *Cancer Cell.* **1**:413–415.
34. Scheijen, B., H. T. Ngo, H. Kang, and J. D. Griffin. 2004. FLT3 receptors with internal tandem duplications promote cell viability and proliferation by signaling through Foxo proteins. *Oncogene* **23**:3338–3349.
35. Schmidt-Arras, D., J. Schwable, F. D. Böhmer, and H. Serve. 2004. Flt3 receptor tyrosine kinase as a drug target in leukemia. *Curr. Pharm. Des.* **10**:1867–1883.
36. Shibuya, N., I. J. Goldstein, E. J. Van Damme, and W. J. Peumans. 1988. Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. *J. Biol. Chem.* **263**:728–734.
37. Tenev, T., S. A. Böhmer, R. Kaufmann, S. Frese, T. Bittorf, T. Beckers, and F. D. Böhmer. 2000. Perinuclear localization of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 and inhibition of epidermal growth factor-stimulated STAT1/3 activation in A431 cells. *Eur. J. Cell Biol.* **79**:261–271.
38. Thiede, C., C. Steudel, B. Mohr, M. Schaich, U. Schakel, U. Platzbecker, M. Wermke, M. Bornhauser, M. Ritter, A. Neubauer, G. Ehninger, and T. Illmer. 2002. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* **99**:4326–4335.
39. Tse, K. F., E. Novelli, C. I. Civin, F. D. Böhmer, and D. Small. 2001. Inhibition of FLT3-mediated transformation by use of a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia* **15**:1001–1010.
40. Wasilenko, W. J., D. M. Payne, D. L. Fitzgerald, and M. J. Weber. 1991. Phosphorylation and activation of epidermal growth factor receptors in cells transformed by the *src* oncogene. *Mol. Cell. Biol.* **11**:309–321.
41. Waugh, M. G., D. Lawson, and J. J. Hsuan. 1999. Epidermal growth factor receptor activation is localized within low-buoyant density, non-caveolar membrane domains. *Biochem. J.* **337**:591–597.
42. Weisberg, E., C. Boulton, L. M. Kelly, P. Manley, D. Fabbro, T. Meyer, D. G. Gilliland, and J. D. Griffin. 2002. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell* **1**:433–443.
43. Yee, K. W., A. M. O'Farrell, B. D. Smolich, J. M. Cherrington, G. McMahon, C. L. Wait, L. S. McGreevey, D. J. Griffith, and M. C. Heinrich. 2002. SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. *Blood* **100**:2941–2949.
44. Yi, T. L., J. L. Cleveland, and J. N. Ihle. 1992. Protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains: characterization, preferential expression in hematopoietic cells, and localization to human chromosome 12p12-p13. *Mol. Cell. Biol.* **12**:836–846.
45. Zhen, Y., R. M. Caprioli, and J. V. Staros. 2003. Characterization of glycosylation sites of the epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* **42**:5478–5492.

# Flt3 Receptor Tyrosine Kinase as a Drug Target in Leukemia

Dirk Schmidt-Arras<sup>1</sup>, Joachim Schwäble<sup>2</sup>, Frank-D. Böhmer<sup>1,\*</sup>, and Hubert Serve<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular Cell Biology, Medical Faculty, Friedrich Schiller University, Jena, Germany, and <sup>2</sup> Department of Medicine, Hematology/Oncology, University of Münster, Germany



**Abstract:** The hematopoietic class III receptor tyrosine kinase (RTK) Flt3 (Flk2, STK1) has recently received much attention as a potential drug target. Activation of Flt3 by different types of mutations plays an important role for proliferation, resistance to apoptosis, and prevention of differentiation of leukemic blasts in acute myeloid leukemia (AML). At least one type of such mutations – an internal tandem duplication in the Flt3 juxtamembrane domain (Flt3-ITD) – has been associated with an unfavorable prognosis. Signal transduction of Flt3 involves activation of several conserved pathways, including the RAS/MAP-Kinase and the phosphoinositide-3-kinase/Akt signaling cascades. Transforming versions of Flt3 exhibit altered signaling, for example a very pronounced activation of STAT5, ultimately resulting in alternate profiles of gene expression and cell transformation. Selective inhibitors of Flt3 tyrosine kinase activity have the potential to suppress aberrant Flt3 signaling.

Although highly homologous to other class III RTKs, Flt3 is resistant to the phenylaminopyrimidine STI571 (Gleevec, Imatinib), a potent inhibitor of other RTKs in the family, such as the PDGF<sub>β</sub> receptor or c-Kit. STI571 binding to Flt3 is prevented by the phenylalanine 691 side-chain in the ATP binding center and mutating this site to threonine renders the corresponding Flt3 mutant sensitive to STI571. Compounds of several other structural families, including the quinoxaline AG1296, the bis(1*H*-2-indolyl)-1-methanone D-65476, the indolinones SU5416 and SU11248, the indolocarbazoles PKC412 and CEP-701, and the piperazonyl quinazoline CT53518, are potent inhibitors of Flt3 kinase. They exhibit different selectivity profiles, both with respect to other kinases and among wildtype Flt3 and its activated versions. These compounds hold promise as novel drugs against AML and as probes for understanding activation mechanisms and signaling pathways in the class III RTK family.

**Key Words:** Flt3, receptor tyrosine kinase, signal transduction, mutations, leukemia, AML, inhibitors.

## INTRODUCTION

The attempts to target oncogenic protein tyrosine kinases with small molecule kinase inhibitors date back into the 1980ies. A major success was the discovery of STI571/ Gleevec/Imatinib. This potent inhibitor of BCR-Abl and of several class III receptor tyrosine kinases (RTKs) is in clinical use for the treatment of chronic myeloid leukemia (CML) and further diseases where the target kinases play a role [1-4]. The STI571-resistant RTK Flt3 has recently emerged as a novel potential drug target, since its activity is frequently altered in acute myeloid leukemia (AML) by overexpression, autocrine activation and by activating mutations. In this review, we describe the structure, signal transduction mechanisms, and the biological role of Flt3. Then, data which implicate Flt3 in the pathogenesis of AML are discussed as well as the types of aberrant Flt3 activation and their consequences for signal transduction. Finally, we review the current knowledge on kinase inhibitors for Flt3 and discuss future prospects of investigation.

## 1. STRUCTURE AND FUNCTION OF THE FLT3 RECEPTOR TYROSINE KINASE

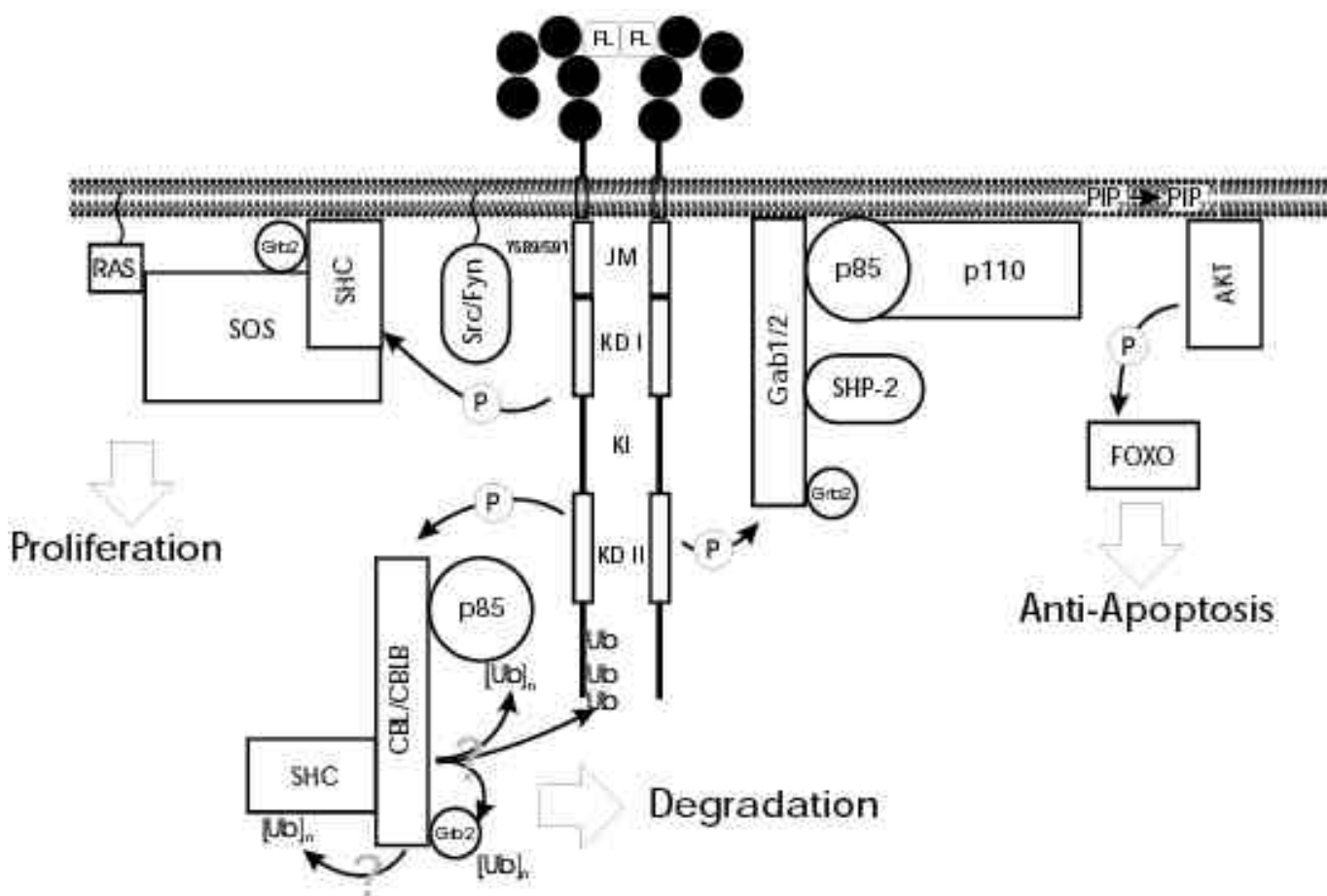
### 1.1. Structure, Expression and Chromosomal Localization of Flt3

The receptor tyrosine kinase (RTK) Flt3 (Fms-like tyrosine kinase 3, also designated Flk-2 or STK-1) is a member of the class III RTKs and shares high homology with the other members of this family, the PDGF (platelet derived growth factor) receptors, c-Fms/M-CSF (macrophage colony stimulating factor) receptor, and c-Kit (receptor for SCF, the stem cell factor). Common features of class III RTK include an extracellular domain consisting of five immunoglobulin like subdomains and a split kinase domain [5-8] (Fig. 1).

The Flt3 protein is encoded by the *FLT3* gene, which is located on chromosome 13q12 in humans [9] and chromosome 5, region G3 in mice [10]. The human *FLT3* gene is organized in 24 exons, of which seven encode the five Ig-like repeats in the extracellular domain. The exons range in size from 83 bp to 562 bp and span approximately 100 kb in total [11]. In mice but not in humans, a second splice variant could be found, which lacks the fifth Ig-like repeat. Nevertheless, this variant is an active kinase and also ligand dependence is intact [12].

\*Address correspondence to these authors at the Department of Medicine/Hematology and Oncology, University of Münster, Albert-Schweitzer-Strasse 33, D-48129 Münster; Fax: +49(251)835-2673; E-mail: serve@uni-muenster.de and Institute of Molecular Cell Biology, Medical Faculty, Friedrich Schiller University, Drackendorfer Strasse 1, D-07747 Jena, Germany; Fax: +49-3641-9325652; E-mail i5frbo@rz.uni-jena.de





**Fig. (1). Structure and signal transduction of Flt3.** The receptor tyrosine kinase (RTK) Flt3 (Fms-like tyrosine kinase 3, also designated Flk-2 or STK-1) consists of an extracellular domain with five immunoglobulin like subdomains, a transmembrane domain and the cytoplasmic domain which comprises the juxtamembrane region (JM), the tyrosine kinase domain I (KDI) and II (KDII) and the intervening kinase insert (KI). Binding of the dimeric ligand FL (Flt3 ligand) triggers the homodimerization of two Flt3 molecules, leading to their activation and trans-autophosphorylation. Some of the Flt3-dependent signaling events are illustrated, including the recruitment and activation of the Src-family kinases Src and Fyn, tyrosine phosphorylation of SHC with subsequent stimulation of the Grb2/SOS/RAS module and the MAP-Kinase cascade, and activation of the PI3 kinase/Akt pathway via Gab1/2. Downstream events are the stimulation of proliferation and an anti-apoptotic effect. Ubiquitination of Flt3 and the signaling mediators p85 and SHC under participation of the E3 ubiquitin ligase CBL/CBLB is one possibility for negative regulation of Flt3 among others. For further details, see text.

The predicted molecular mass of the nascent Flt3 protein is 110 kDa. As a consequence of posttranslational glycosylation, two entities with apparent molecular masses of 130 and 150 kDa are formed. The extracellular domain of the Flt3 protein contains nine sites that could potentially serve for the attachment of *N*-linked carbohydrates. Indeed, treatment with different glycosydases showed that Flt3 contains *N*-linked, but not *O*-linked sugars. Only the 130 kDa form was sensitive to Endo H treatment, suggesting that this form represents an intermediate form containing high-mannose *N*-linked sugars [13, 14].

Although Flt3 was initially cloned from fetal liver hematopoietic cells [7], its expression is not restricted to this tissue. Expression of Flt3 protein could be detected in placenta, brain, cerebellum, testis, lymph nodes, thymus, and in the liver of 6- to 8-week-old mice [14]. More detailed investigations in neuronal tissues revealed highest expression in Purkinje neurons of the cerebellum and, to a lesser extent, in granule neurons of the hippocampus, the anterior olfactory

nucleus, in the preoptic area [15] and also in the retina [16]. The best characterized tissue concerning Flt3 expression remains the bone marrow. There, Flt3 is expressed in early multipotent progenitor cells, but not in primitive stem cells. Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup> cells efficiently reconstitute B and T lymphopoiesis, but display defects in myeloid repopulation [17]. Thus, acquisition of Flt3 expression seems to be accompanied by a loss of self-renewal capacity in the hematopoietic stem cell compartment. Flt3 expression remains detectable during monocytic differentiation, whereas the expression is lost during B-lymphoid and granulocytic maturation [17-20].

Only few data are available on the transcriptional regulation of Flt3 expression. AML1<sup>-/-</sup> mice, which lack the myelogenous transcription factor AML1, do not express Flt3. This is consistent with the presence of a potential AML1 binding site 109-114 nt upstream of the transcriptional start site [11]. It has also been shown that treatment with Il-6 reduces, whereas TGF- $\beta$  1 increases expression of Flt3 [21]. Given the importance of Flt3 expression in several pathological

conditions (see below), a better understanding of its expression regulation seems very desirable.

## 1.2. The Function of Flt3 for Normal Hematopoiesis

The above described expression pattern of Flt3 (1.1.) suggests important functions of this kinase in hematopoiesis. This notion is supported by the analysis of mice with an inactivated *FLT3* gene. However, the observed phenotypes are rather mild [22]. *FLT3*<sup>-/-</sup> mice developed normally, were fertile and appeared healthy. Peripheral blood smears and differential blood counts showed no morphological or quantitative abnormalities. However, a more detailed analysis of the bone marrow revealed decreased levels of B220<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> pro-B cells, whereas the amount of pre-B cells, erythroid, and myeloid progenitors was normal. The amount of primitive B lymphoid progenitors was 10-fold reduced as revealed by long-term cultures. Competitive repopulation experiments, in which wild-type and *FLT3*<sup>-/-</sup> bone marrow were mixed and transplanted to lethally irradiated mice revealed that both myeloid and B lymphoid precursors from *FLT3*<sup>-/-</sup> bone marrow had a two- to fourfold repopulation disadvantage compared to wildtype precursors. Thymic T cells and splenic B cells of the recipient were derived almost completely from wild-type competitor cells. These experiments demonstrated an important function of Flt3 in the generation of myeloid and lymphoid cells. The fact that mice can largely compensate the loss of Flt3 is encouraging for strategies where Flt3 is used as a drug target. Toxic effects resulting from inhibition of normal Flt3 functions can be expected to be limited.

## 1.3. Expression and Structure of the Flt3 Ligand FL

The gene encoding the Flt3 ligand FL - *FLT3L* - is located on chromosome 19q13.3 in humans, and on chromosome 7 in mice. The human *FLT3L* gene comprises 8 exons and encodes a 235-amino acid type I transmembrane protein. It consists of an N-terminal 26-residue signal peptide, a 156-residue extracellular domain, a 23-amino acid transmembrane domain, and a 30-residue cytoplasmic domain. Soluble FL, a 20 kDa protein, can be generated either by an alternative splicing of exon 6, or it can be released by proteolysis from the membrane-bound FL [23, 24]. Soluble FL has a short chain four-helical bundle structure that is stabilized by three intramolecular disulfide bonds. It forms non-covalent homodimers, where the residues 25-30 and 63-68 of one monomer constitute a large hydrophobic area that interdigitates with the equivalent segments of the other monomer. Nine amino acid residues are indispensable for receptor binding and biological activity. They cluster around the poles of the FL dimer approximately 45 Å apart. In membrane-bound FL, they are facing away from the plasma membrane consistent with the finding that this form of FL is also bioactive. Despite the fact that PDGF dimers are built up of a cystine-knot structure, FL and PDGF display the same overall dimensions (approximately 70 Å x 35 Å x 25 Å). It is therefore likely that FL, as PDGF, binds to the second and third Ig-like subdomain in the extracellular part of Flt3 [24] (Fig. 1).

Northern Blot analyses revealed ubiquitous expression of FL in murine tissues, except in the brain. The highest levels of FL mRNA could be detected in peripheral leukocytes [25]. Human bone marrow stromal cells produce mRNAs for

both the transmembrane and the soluble forms of FL [26]. The expression of FL is increased in the liver and spleen of mice, which are double transgenic for Il-6 and the soluble Il-6 receptor [27].

## 1.4. When FL is Missing...

Targeted disruption of the *FLT3L* gene in mice led to a more severe phenotype than disruption of the *FLT3* gene [28]. *FLT3L*<sup>-/-</sup> mice bred normally and displayed no overt phenotype. However, peripheral white blood cell numbers were reduced by 45% with predominant reduction in lymphocytes.

Detailed analyses of the bone marrow revealed a 27% reduction in total cell number that resulted from a decrease in B220<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> immature B lymphocytes and a decrease in CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> immature myeloid cells. Colony forming assays of *FLT3L*<sup>-/-</sup> bone marrow revealed a remarkable decrease in B-lymphoid precursors (B-CFU). Single cell suspensions from whole spleens and lymph nodes revealed a reduced cellularity of both organs in *FLT3L*<sup>-/-</sup> mice as compared to the wildtype. Analysis by flow cytometry showed a reduction in total numbers of both T and B lymphocytes but the ratio between B and T cells was normal. Although B lymphopoiesis is impaired in *FLT3L*<sup>-/-</sup> mice, peripheral B lymphocytes appear to function normally.

In lymphoid tissues, both myeloid related (CD11c<sup>+</sup> CD8a<sup>-</sup>) as well as lymphoid related (CD11c<sup>+</sup>CD8a<sup>+</sup>) dendritic cells (DC) were reduced dramatically. Nevertheless, DC purified from *FLT3L*<sup>-/-</sup> spleen were able to stimulate allogeneic T-cell proliferation. The number of natural killer cells (NK1.1<sup>high</sup>, CD3<sup>-</sup> NK cells) in the spleen was reduced 5-fold but NK cell functions remained intact.

It is currently not known why loss of FL is more severe than loss of Flt3. There are no hints for another receptor of FL, except Flt3. It is possible that the differences between *FLT3*<sup>-/-</sup> and *FLT3L*<sup>-/-</sup> phenotypes are related to the different genetic backgrounds that were used for the analyses.

## 1.5. Early Signals Emitted by Flt3

Generally, Flt3 signal transduction (Fig. 1) is hitherto less well characterized than signal transduction of other class III family members. Ligand binding induces a rapid onset of Flt3 tyrosine phosphorylation, which peaks at five minutes and declines after 15 min. Tyrosine phosphorylation is – by analogy to other class III RTKs – due to trans-autophosphorylation of two receptor subunits. In addition, other tyrosine kinases may contribute to Flt3 tyrosine phosphorylation (see below). Numerous signaling molecules have been proposed to be involved in Flt3 signal transduction. Activation of the receptor involves the recruitment and activation of the Src family kinases Src and Fyn, which may participate in the phosphorylation of the receptor and of downstream signaling molecules [29]. Sequence comparison between human Flt3 and the PDGF –receptor reveals a high degree of sequence homology in the juxtamembrane region suggesting a potential Src and STAT5 binding site at Flt3 Y589/591. Indeed, activation of Flt3 induces the specific phosphorylation of STAT5a, but not of STAT5b [30]. Very recently, Murata *et al.* [31] could show that one of both Y589 or 591 is necessary for the activation of STAT5a. Earlier, it has been

observed that truncation of the Flt3 C-terminus leads to a decrease of the STAT5a phosphorylation suggesting that this region of the receptor participates at least partially in STAT5a activation [30]. Compared to transforming variants of Flt3 (see below), activation of STAT5a by wildtype Flt3 is relatively weak and transient. The biological importance of STAT5a activation for normal Flt3 function remains to be clarified.

One of the major phosphorylated Flt3 substrates is the adaptor protein SHC [32]. FL-induced tyrosine phosphorylation of SHC involves the Grb2 binding sites Y239, Y240, and Y313. Indeed, FL-dependent recruitment of Grb2 to SHC has been shown, suggesting that SHC phosphorylation is likely to couple Flt3 activation to the RAS/MAP-Kinase pathway. Interestingly, FL-induced phosphorylation of SHC is independent of the functional SHC PTB or SH2 domain. Also, it does not require phosphorylation of murine Flt3 at Y769, 985, or 972. These observations suggest that FL-induced SHC phosphorylation does not depend on an association of SHC to Flt3, but that it may only require its recruitment to the membrane via phospholipids. In addition to Grb2, Flt3 activation causes association of the phosphatidylinositol phosphatase SHIP to phosphorylated SHC via a mechanism that requires the intact SHC PTB domain [32]. In addition, Flt3 can also activate the RAS/MAP-Kinase pathway via direct interaction with Grb2. The phosphotyrosines 769 and 958 of murine Flt3 have been implicated in the Grb2 association [29, 32].

The phospholipase C isoform PLC that couples receptor tyrosine kinase receptors to the hydrolysis of phosphatidylinositol-4,5 biphosphate is recruited to Flt3 via its two SH2 domains. It is very transiently phosphorylated between 30 seconds to 1 minute after Flt3 activation.

The SH2 domain-containing protein Vav-1 is exclusively expressed in hematopoietic cells. Vav-1 has been shown to function as a GTP exchange factor for the small GTPases Rac and Cdc42 that are involved in cytoskeletal rearrangements [33]. Although Vav-1 has not been shown to associate with Flt3, activation of the receptor leads to an increase of its phosphorylation within 30 seconds to 5 minutes after ligand stimulation [29, 34].

Upon growth factor receptor-mediated activation, class IA phosphoinositide-3 kinases (PI3K) catalyze the phosphorylation of phosphoinositides at the D3 position in the inositol ring. The products of this reaction induce a plethora of cellular events including anti-apoptosis, mitogenesis, and receptor internalization. The enzymes of this class consist of regulatory p85 subunits that contain SH2 domains, and of catalytic p110 subunits. Recruitment of PI3Ks to activated RTKs leads to tyrosine phosphorylation of p85 and activation of the catalytic p110 subunit. After ligand stimulation of murine Flt3, p85 gets phosphorylated and binds to Y958 in the C-terminus within a p85 binding consensus site (YQNM) [34]. Experiments with Y958F mutants showed, however, that Flt3-induced PI3Kinase activity is not necessary for mitogenesis of Ba/F3 cells, or for receptor internalization [35]. In contrast, human Flt3 lacks this C-terminal binding site and seems not capable to directly associate with p85. Despite the lack of direct binding, activation of human Flt3 also leads to rapid phosphorylation of p85 [29]. Recent studies revealed that activation of human Flt3 induces the

binding of the p85 subunit to the adaptor proteins Gab1 and Gab2 [36-38]. The Gab (Grb2 associated binder)-family proteins share an overall domain structure: It involves an N-terminal pleckstrin homology (PH) domain, which is responsible for their targeting to the plasmamembrane, and a phosphotyrosine-interaction domain also designated as c-Met binding domain (MBD). Further domains include a proline-rich region, and several well conserved SH2-domain binding sites, including sites for the association with Grb2, p85, the adaptor molecules Crk and CrkL, and the protein-tyrosine phosphatase (PTP) SHP-2 [39]. Both Gab1 and Gab2 transduce a signal to the Ras/MAP-Kinase pathway but seem to differ in other aspects of their downstream signaling [40]. In the case of Flt3, both Gab1 and Gab2 are transiently phosphorylated in a ligand dependent manner, and show an inducible association with p85 and SHP-2. Also a constitutive association with Grb2 was detected which is likely to be mediated through the Grb2 SH3 domain. A direct association of Gab1 or Gab2 with Flt3 could, however, not be demonstrated [36-38].

Flt3 phosphorylates the 100 kDa proteins CBL and CBLB, which have recently been identified as E3 ubiquitin ligases that are involved in the ubiquitination and subsequent degradation as well as in the internalization of the PDGFR, M-CSFR, and EGFR [41-43], and also of PI3Kinases [44]. Although CBL can mediate poly-ubiquitination, a very recent report shows that the RTKs PDGFR and EGFR are mono-ubiquitinated on multiple sites in a CBL-dependent manner. The mono-ubiquitination is necessary for their internalization and for lysosomal degradation [45]. Similarly, CBL and CBLB may regulate Flt3 through lysosomal or proteasomal degradation, but so far this has not been investigated. Activation of Flt3 induces also the phosphotyrosine-dependent association of CBL and CBLB with p85 and SHC, which may affect the stability of these signaling molecules. Finally, CBL and CBLB have been proposed to regulate the Ras pathway by competing with SOS for binding to Grb2 [46, 47].

Another regulator of Flt3 signaling may be the 120 kDa protein GAP. GAP stimulates the GTPase activity of Ras. In murine B-lymphoid Ba/F3 cells, p120<sup>GAP</sup> is tyrosine phosphorylated already 30 seconds after Flt3 activation and phosphorylation is detectable until 10 minutes. GAP does not seem to associate with Flt3 directly [29], although the N-terminal SH2 domain of p120<sup>GAP</sup> showed interaction with Flt3 in pulldown assays [34].

In general, RTK signaling is also modulated and negatively regulated by PTPs [48]. Almost nothing is known yet, however, about PTPs in the negative regulation of Flt3. According to our own data, ligand-activated Flt3 is rapidly dephosphorylated in different cellular backgrounds. The PTP SHP-1 has the capacity for negative regulation of signaling, but the biological relevance of this interaction remains to be established (Schmidt-Arras *et al.*, unpublished data).

## 1.6. FL Induced Gene Expression

Suppression of apoptosis seems to be a major biological effect of Flt3 activation. Several lines of evidence suggest that Flt3 exerts an anti-apoptotic action by modulating the expression of regulators of apoptosis. For example, using AML blasts, Lisovsky *et al.* showed a reduction of apoptotic cells when cultures were maintained for 3 days in the

presence of FL. Analysis of the non-apoptotic cells displayed a lower expression level of the pro-apoptotic protein Bax, whereas the protein level of the anti-apoptotic Bcl-2 was not affected by FL [49]. A part of the anti-apoptotic regulation of gene expression is likely to be mediated by Flt3-dependent activation of PI3K and subsequently PKB/Akt. Forkhead transcription factors (recently termed FOXOs) are known downstream targets of PKB/Akt and their phosphorylation leads to retention in the cytoplasm and subsequent inactivation (Fig. 1). Thereby, the pro-apoptotic transcriptional activity of FOXOs is prevented [50, 51]. Indeed, a constitutively active Flt3 mutant (Flt3-ITD, see 2.2.) has recently been linked to the phosphorylation of FOXO-1 and FOXO-3a by PKB/Akt (B. Scheijen *et al.*, personal communication).

In a very recent publication [52], several Bcl2-family-associated antiapoptotic pathways have been described that originate from Flt3 receptors. Interestingly, differences between wildtype and constitutively active oncogenic forms of the receptor (see below) seem to exist. Flt3-wildtype induced phosphorylation of the proapoptotic Bcl2 family member Bad at two sites, one (Ser-112) mediated by MAPK-dependent pathways, the other (Ser-136) by PI3K/Akt. These phosphorylating events have been shown to inhibit Bad function. Activation of wildtype Flt3 did not induce expression changes in other Bcl2 family members. In contrast, an oncogenic Flt3 isoform induced the STAT target gene Bcl-XL, an antiapoptotic member of the Bcl2 family. In a series of experiments from our own laboratories including microarray gene expression analyses, we also saw profound differences in expression profiles induced by ligand-activated wildtype receptors and the oncogenic Flt3 isoforms [53]. These differences will be discussed below (see 2.4).

The beta-1 integrins play a central role in the adhesive interactions between hematopoietic progenitors/stem cells and the bone marrow stromal cells. Both  $\alpha_4\beta_1$  and  $\alpha_5\beta_1$  integrins are expressed on hematopoietic progenitor cells. A recent study showed that FL can induce the expression of the beta-1 integrins VLA-4 and VLA-5 and therefore might influence the homing and retention of progenitor cells in the bone marrow [54].

By yeast two-hybrid screening the Flt3 interacting zinc finger (Fiz) has been identified [55]. Fiz is a 60 kDa protein containing 11 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc fingers and is ubiquitously expressed. Fiz localizes to the nucleus as well as to the cytoplasm and associates with Flt3 in an FL-dependent manner. Recently the retinal bZIP transcription factor NRL has been shown to interact with Fiz [16]. Both proteins, Fiz and Flt3, could be detected in murine retina and overexpression of Fiz reduced the NRL-dependent transactivation of a rhodopsin promoter construct. These data suggest a role of Fiz as a transcriptional repressor which is under control of Flt3.

## 2. ROLE OF FLT3 IN LEUKEMIA

### 2.1. Flt3 Expression in Hematopoietic Malignancies

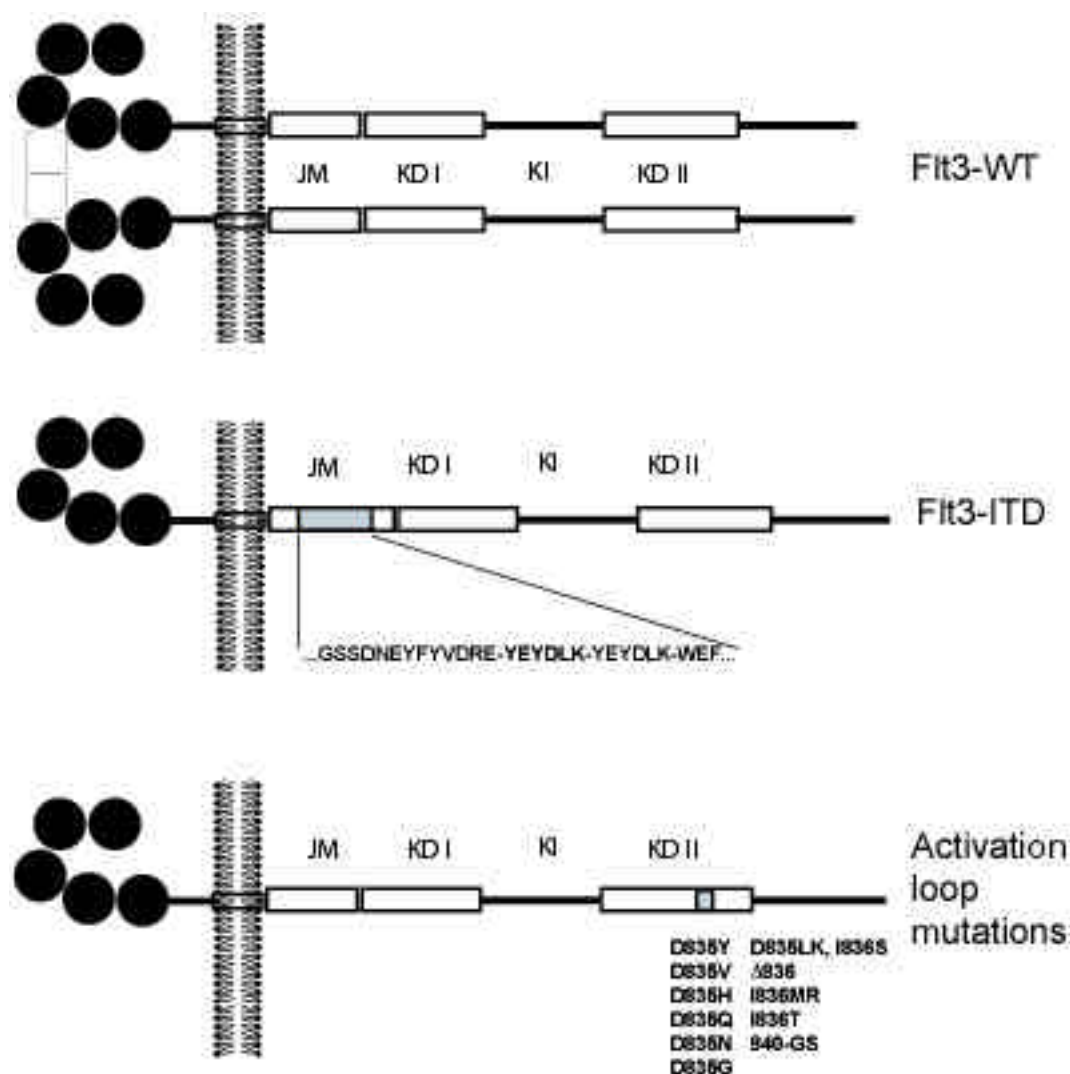
As described above, Flt3 is expressed in normal hematopoietic progenitor cells during a restricted period of early maturation. Here it mediates important signals for cell growth, proliferation, survival, and migration. Expression analyses in hematologic malignancies revealed Flt3 expression in acute leukemias of myeloid and B-precursor lineages. Acute

myeloid leukemia (AML) is characterized by the infiltration of the bone marrow with highly proliferative cells - leukemic blasts - that arrest at different stages of myeloid differentiation. AML cases are traditionally classified according to their morphological appearance in relation to normal hematopoietic progenitors, using a classification system developed by a French-American-British group (the FAB classification).

Although Flt3 expression is absent in the normal counterparts of most of the AML blast types, its expression in a high proportion of blasts has been detected in 62 to 92% of AML cases. Several types of other hematologic malignancies have been analyzed for the expression of Flt3, and it is expressed in most cases of B-precursor acute lymphocytic leukemia's (ALL), whereas it is much less abundant in T-ALL. Furthermore, Flt3 expression was found in lymphoid and myeloid blast crises of CML and in some cases with myelodysplastic syndrome [56-60]. FL has been shown to induce Flt3 autophosphorylation and to promote proliferation and survival of Flt3-positive leukemic blasts *in vitro*, either alone or in combination with G-CSF, GM-CSF, Interleukin-3, and SCF, the ligand for Kit [49, 57, 58, 61]. These findings suggest a relevant role of Flt3 in mediating proliferation and survival of leukemic blasts. Also, many leukemia cell lines of the myeloid and B-lymphoid lineages have been shown to express functional Flt3 receptors and to respond to FL by enhanced proliferation and survival. Interestingly, a remarkable portion of Flt3-positive cell lines also produce FL, suggesting a possible autocrine stimulatory loop of Flt3 in AML [60, 62, 63]. The existence of an autocrine activation of proliferation in such cell lines is also indicated by growth inhibition with selective Flt3 inhibitors (see below).

### 2.2. Activating Flt3 Mutations in Leukemia

In 1996, Nakao and coworkers first noted mutations of Flt3 in bone marrow samples from AML patients. In 5 of 30 patients, they described the occurrence of in-frame insertions of several nucleotides in the mRNA sequence encoding the juxtamembrane domain of the receptor. In all patients, wildtype Flt3 was coexpressed with the mutated form [64]. Sequencing of the mutant alleles of this and further patient sample series revealed internal tandem duplications (ITD) of varying length, resulting in the repetition of a stretch from 4 to up to 50 amino acids in the juxtamembrane region of the receptor (Fig. 2, Table 1). The mechanism of how these mutations arise has not been extensively studied. However, in one paper it is discussed that the palindromic sequence of the *FLT3* gene corresponding to the codons for D593 to K602 might, together with an impaired DNA repair mechanism, contribute to the generation of the Flt3-ITD mutations [65]. Meanwhile, several groups published data on the prevalence of Flt3-ITD in large cohorts of AML patients, which varies between 13.2 and 34% [66-78]. In total, 963 cases with presence of Flt3-ITD have been found in a population of 4173, indicating a prevalence of 23.1%. The frequency of the mutations according to FAB subgroups of AML differs considerably, with less abundance in the FAB M2 (with signs of myeloid differentiation) and M6 (with erythroid differentiation characteristics) subtypes [67, 69, 71, 72, 79] and a relatively high frequency in the FAB M3 subtype, the acute promyelocytic leukemia (APL) characterized by the



**Fig. (2). Different types of activating Flt3 Mutations in AML.** Flt3 is physiologically activated by binding of its ligand FL to the wildtype receptor (Flt3-WT). Mutations in two hot spots of the Flt3 gene lead to autoactivation of the receptor: First, internal tandem duplications in the juxtamembrane region of the receptor (Flt3-ITD) leading to in-frame insertions of a stretch of amino acids that differs from patient to patient. Second, mutations in the activation loop of Flt3, which is located in the second kinase domain. Point mutations, deletions or small insertions are found at Asp835 or closely downstream. Abbreviations are explained in the legend to Fig. (1).

t(15;17) translocation [71, 74, 80]. Cytogenetic analyses revealed the highest prevalence of Flt3-ITD in cases with normal karyotype. Flt3 mutations occur rarely together with t(8;21) aberrations [71, 72].

The prognostic significance of Flt3-ITD mutations has been controversially discussed during the last years. In the majority of studies, the detection of Flt3-ITD was associated with an unfavorable prognosis of the patients, with reduced disease free and overall survival due to an increased relapse rate [66, 69-75]. In most cases, both the ITD-mutated alleles and the wildtype allele are transcribed so that both wildtype and mutated Flt3 are coexpressed in AML blasts. There is growing evidence that reduction or loss of expression of the wildtype mRNA is of prognostic impact and that patients who lost expression from the wildtype allele have a critical prognosis [72, 73, 75]. Especially in FAB M3 subtypes of AML, Flt3-ITD mutations are also associated with high white blood counts, a high percentage of bone marrow blasts

and high levels of LDH at diagnosis [69, 70, 73, 80], all associated with increased risks for treatment failure.

In pediatric patients with AML, Flt3-ITD seems to be less abundant (5.3% to 24.5%) compared to adult AML [81-85]. Two research groups found that patients below the age of 10 very rarely have Flt3-ITD-positive AML, whereas they did not find any difference in the prevalence in the age group 10-18 [82, 86]. In children, the expression of Flt3-ITD clearly indicates a relatively bad prognosis.

On the other hand, in the large group of AML patients above 60 years, ITD mutations are relatively frequent and no clear association between Flt3-ITD and a bad prognosis was found [76]. Current treatment of AML is most successful in young patients, and AML in the elderly is associated with a relatively bad prognosis, due to reasons of co-morbidity, but also because in this age group other bad biological indicators like complex karyotypes are more frequent than in younger

patients. These factors might mask the biologic effects of Flt3-ITD.

**Table 1. Activating Mutations of Flt3 in Leukemia**

Mutation	Location	References (selected examples)
Flt3-ITD	Juxtamembrane region	[64]
Point mutations of D835:  D835X D835Y D835V D835H D835Q D835N D835G	Activation loop	[79, 99]
Other mutations:  D835LK, I836S 836 I836MR I836T 840GS-Insertion	Activation loop	[72, 100, 102]

Flt3-ITD mutations have also been found in myelodysplastic syndromes, even though the frequency is very low [67, 87, 88]. In longitudinal studies, it was found that the appearance of ITD mutations in myelodysplastic bone marrow may indicate its leukemic transformation [88].

Flt3-ITD mutations are not very stable during the evolution of AML. Between first diagnosis and relapse new ITD mutations were observed in the same patient. In some cases, Flt3-ITD mutations were absent in relapse, although they had been present at the initial presentation of the AML [89-92]. Thus, the use of Flt3-mutations to monitor minimal residual disease after therapy might be limited.

The transforming ability of Flt3-ITD in myeloid cells has also been examined in mouse models. Injection of Flt3-ITD-transfected 32D cells into a syngeneic mouse strain caused a fatal disease in the recipient animals, with infiltration of the bone marrow, liver, spleen and other organs by the injected cell line [93]. Autoactivation of Flt3 by fusion to TEL (Flt3-TEL) caused the same phenotype [94]. In a primary murine bone marrow transplant model, Flt3-ITD induced a myeloproliferative disease, but no AML [95]. The same model in PML/RAR transgenic mice caused manifest APL, suggesting a cooperation between both mutations in transformation of myeloid cells to AML blasts [96].

More recently, a series of other Flt3 mutations has been found in AML (Fig. 2, Table 1). Most of these mutations are point mutations in the activation loop. This structure has repressive functions in several RTKs, including other members of the RTK III family [97, 98]. The most frequent target of these mutations is the aspartic acid at position 835 (D835). Substitutions by tyrosine, valine, histidine, glutamic acid, and asparagine have been described, with tyrosine being most frequent. The prevalence of point mutations at this site, which are relatively easy to detect since they elimi-

nate a restriction site, is lower than the prevalence of Flt3-ITD: 7% in AML, 3% in MDS, and 3% in ALL [79, 99]. So far, only in one study a correlation of activating loop mutations with leucocytosis at diagnosis and worse prognosis was found [70]. Besides single amino acid substitutions, several other mutations in the activating loop have been described, including substitutions associated with single amino acid insertions, or larger insertions in the vicinity of D835 (Table 1) [100-102].

Taken together, Flt3 mutations represent the most frequent molecular aberration known to occur in AML. Several types of mutations have been shown to cause activation and aberrant signal transduction of the receptor. The evidence that these mutations have a role in AML pathophysiology is overwhelming and it seems very promising to target the receptor in cases with Flt3 mutations.

Whether overexpression of wildtype Flt3 has any role in leukemic transformation is a matter of debate. Of note, it has been shown recently in a microarray analysis of childhood acute leukemias that cases with translocations involving the MLL gene express very high levels of Flt3 mRNA [103]. In a second paper the authors demonstrated that a MLL-positive cell line displayed an amplification of the *FLT3* gene locus resulting in high Flt3 protein expression and constitutive autophosphorylation of the receptor [102]. The cells were sensitive to growth inhibition *in vitro* and in a xenograft model to a tyrosine kinase inhibitor targeting Flt3 (PKC412, see 3.3.). This paper argues in favor of the hypothesis that overexpression of wildtype Flt3 might contribute to leukemic transformation. On the other hand, data cited below that describe qualitative differences in the nature of the signals by wildtype or mutated receptors argue against a role of Flt3 wildtype overexpression in the development of AML. Also, clinical data implicate a bad prognosis to be associated with ITD positivity that might even be alleviated by Flt3 wildtype coexpression (see above). Definitive answers to the question of the importance of wildtype Flt3 in the initiation or maintenance of human leukemias will come from clinical trials with Flt3-specific tyrosine kinase inhibitors. Since the question is open, these trials should not be exclusively performed in cases with proven Flt3 mutations.

### 2.3. Mechanism of Flt3 Activation by Mutations

Studies about the mechanisms that activate Flt3 as a consequence of the different classes of mutations are sparse. Kiyoi *et al.* have shown that a short protein consisting of the extracellular, transmembrane and ITD-mutated juxtamembrane domains of Flt3 forms heterocomplexes with coexpressed wildtype Flt3 [104]. This is not observed, if the wildtype juxtamembrane domain is used instead. The heterocomplexes induce constitutive autophosphorylation of the receptor as well as activation of downstream signaling cascades and cytokine-independent growth in Ba/F3 cells. In the same paper, earlier results from the study of Kit mutations were recapitulated showing that insertions as well as deletions in the juxtamembrane region of the receptor induce ligand-independent receptor activation [104-106].

These reports indicate that activation of Flt3 by the ITD mutations occurs through the loss of a repressive function of the Flt3 juxtamembrane domain for Flt3 activation. The analogy to other kinases of the same family suggests that this

hypothesis might indeed be true. For example, studying Kit activation, the Rottapel laboratory has recently shown that a peptide corresponding to the Kit juxtamembrane domain forms a secondary structure that binds to the Kit catalytic domain. This structure is interrupted, if known activating mutations of Kit are incorporated into the peptide or if it is phosphorylated on tyrosines [107]. Strong evidence for a repressive function of the juxtamembrane region comes also from crystallographic studies of another RTK. The juxtamembrane region of EphB2 inhibits enzymatic activity by binding to the kinase domain and preventing it from assuming an active conformation. Phosphorylation of juxtamembrane tyrosines relieves this intramolecular repression [108].

The other known mutations in AML cluster in the so-called activation loop, another regulatory structure in tyrosine kinases. In an unphosphorylated state, the activation loop inhibits kinase activity. Phosphorylation of a tyrosine residue within this loop, as it occurs early after ligand binding, leads to changes in the structure of the activation loop and in turn relieves the repression of enzyme activity. Point mutations in residues, which stabilize the activation loop structure in the inactive state, have a similar effect as phosphorylation. Activation loop mutations have been reported to cause constitutive activation of a number of tyrosine kinases (for reviews see [97, 109]). Experiments with Flt3 kinase inhibitors (see 3.3.) suggest that different Flt3 mutations may in fact result in somewhat different structures of the kinase active site. The detailed understanding of the activation mechanisms by mutations will require the availability of Flt3 crystal structures.

#### **2.4. Aberrant Signal Transduction by Flt3 Mutations**

In recent years, several groups have studied the signal transduction and biological consequences of activating Flt3 mutations. Kiyoi and colleagues showed ligand-independent Flt3 autophosphorylation upon transfection of Flt3-ITD in COS7 cells [65]. Hematopoietic progenitor cell lines of myeloid (32D) or lymphoid (Ba/F3) origin, stably transfected with mutated Flt3, were used to characterize the cell biological consequences of Flt3 mutant expression and activity. Expression of Flt3-ITD or of the Flt3 activation loop mutations induces these cells to proliferate factor-independently, and to display radiation resistance and clonogenic growth in methylcellulose. Furthermore, constitutive activation of the STAT5, Ras/MAP-Kinase, and PI3K/Akt pathways has been observed [93, 94, 110, 111]. In these studies, profound differences were found between signaling properties of ligand-activated wildtype receptors and mutationally activated Flt3-ITD. For example, activation of STAT5a is only rather weak by ligand-activated wildtype Flt3, whereas Flt3-ITD activates STAT5a strongly and constitutively. Furthermore, clonal growth of 32D cells in methylcellulose could only be achieved by Flt3-ITD but not by the ligand-stimulated wildtype receptor [93]. In line with these observations is the recent report about signaling differences between Flt3 wildtype and FLT3-ITD towards apoptosis prevention mentioned earlier (1.6) [52]. These findings suggest, that Flt3-ITD can activate additional aberrant signaling pathways, possibly by alterations of the substrate specificity or the autophosphorylation pattern of the receptor. We recently compared gene expression profiles of 32D cells

transfected either with ligand-activated wildtype Flt3 or Flt3-ITD by a microarray analysis [53]. We found profound differences, including a strong induction of STAT target genes and suppression of myeloid transcription factors like C/EBP $\alpha$  or PU.1 by Flt3-ITD but not Flt3 wildtype. The latter findings revealed not only aberrant proliferative and survival signals by Flt3-ITD, but also implicated a negative influence of Flt3-ITD on myeloid differentiation. An equivalent observation has recently been made by another group, showing a block of differentiation of 32D cells by Flt3-ITD that could be overcome by treatment with a selective Flt3 kinase inhibitor [112]. Constitutive Flt3 phosphorylation, aberrant STAT activation as well as autonomous proliferation after transfection into IL3 dependent cell lines has also been shown for mutations of the activating loop of Flt3 [100, 101].

It will be interesting to see further analyses of the structure-function relationships of the different Flt3 domains that play a role in its mutational activation. Elucidating these mechanisms might enable us to more efficiently and specifically interfere with this pathological process. Furthermore, the different mutations seem to elicit different signals and thus may influence the pathophysiological process of AML in different ways. Studies on the effects of different mutations on Flt3 localization and its substrate specificity as well as on the function of hematopoietic progenitor cells are under way that will give us more understanding about the molecular basis of their dramatic biological effects.

### **3. INHIBITORS OF FLT3 KINASE ACTIVITY**

#### **3.1. The Potential of Tyrosine Kinase Inhibitors**

Since the discovery of oncogenic tyrosine kinases, the possible use of selective inhibitors for cancer therapy has been explored [113, 114]. The pioneering discoveries of naturally occurring kinase inhibitors such as erbstatin [115] or genistein [116], and of the synthetic 'tyrphostins' [117] with remarkable selectivity for different kinase families [113] was followed by large drug discovery programmes in the pharmaceutical industry. They led to selective inhibitors, often with efficacy in the nanomolar range, holding great promise for therapy. It took, however, until 2001 that with STI571 (CGP57148, Gleevec, Imatinib) the first tyrosine kinase inhibitor obtained approval for clinical use [2, 3]. The phenylaminopyrimidine STI571 potently inhibits kinase activity of BCR-ABL, the oncogenic tyrosine kinase which drives proliferation of tumor cells in chronic myeloid leukemia [118]. In addition, it inhibits the class III receptor tyrosine kinases PDGF $\alpha$  and  $\beta$ -receptor, c-Kit [119], and the Abl-related tyrosine kinase ARG [120]. It is readily orally available and exhibits little toxicity at therapeutically effective doses. Although it is too early to evaluate the effect of STI571 on the long term clinical outcome of CML, it dramatically improves life quality and duration of the asymptomatic state of CML patients, and it is currently widely used. The success of STI571 greatly stimulated the search for tyrosine kinase inhibitors with other applications.

The emerging role of Flt3 and of constitutively active Flt3 mutants in AML strongly suggested that Flt3 kinase inhibitors might present novel therapeutic agents for this disease [121]. The first study on the use of a Flt3 tyrosine kinase inhibitor came from the laboratory of Naoe [122]. The



authors demonstrated that Herbimycin A, a natural compound from *Streptomyces* sp. which was originally discovered as an inhibitor of Src kinase [123], also inhibits Flt3 and can reduce growth of Flt3-ITD transfected cells *in vitro* and *in vivo* [122]. The same laboratory later demonstrated that the effect of Herbimycin A occurs largely by inhibiting the interaction of Flt3-ITD with Hsp90. In turn, degradation of Flt3-ITD is triggered [124]. Wildtype Flt3 is apparently more stable in the absence of Hsp90 and therefore not affected by Herbimycin A [124]. Efficacy of a direct tyrosine kinase inhibitor against Flt3 was first shown by the laboratory of Small in 2001 [125, 126]. These authors tested the quinoxaline tyrphostine AG1296 (Fig. 3a), a compound previously established as rather selective inhibitor of PDGF - and -receptor and c-Kit [127-129]. AG1296 inhibited the activity of both, Flt3 wildtype and Flt3-ITD with an IC<sub>50</sub> of about 0.3  $\mu$ M. It blocked Flt3-dependent growth of Ba/F3 cells and, importantly, suppresses the growth of leukemic blasts from AML patients [126]. While AG1296 because of its relatively low potency and its pharmacokinetic properties is not a candidate for further development, these first studies clearly show the potential of Flt3 tyrosine kinase inhibition for the treatment of AML.

### 3.2. Mechanism of Flt3 Resistance to STI571/Gleevec

Since AG1296 besides inhibiting Flt3 was originally found as a PDGF receptor kinase inhibitor [127], the obvious question arises whether other known PDGF receptor kinase inhibitors may have efficacy for Flt3. Most interesting would, of course, be STI571 since it is already in clinical use. Unfortunately, STI571 does not inhibit Flt3 [119]. In collaboration with S. Dove und S. Mahboobi, we have addressed the question why this might be the case [130]. Since crystal structures of the kinase domains of neither PDGF receptors nor Flt3 are available, a structure of STI571 bound to the kinase domain of the PDGF -receptor was obtained by molecular modeling (Fig. 4). This structure has great similarity to the crystal structure of STI571 in complex with the Abl kinase domain [131, 132]. Upon comparison of the primary amino acid sequences of PDGF -receptor and Flt3 in the parts of the kinase domain contacting STI571, we observed a remarkable sequence difference in the 5 strand, which is otherwise highly conserved. Instead of a threonine (aa 681) in the PDGF -receptor, the Flt3 sequence contains a phenylalanine (aa 691). According to the model, the hydroxyl group of T681 is engaged in a hydrogen bond with STI571. Replacement of threonine with phenylalanine in a model of Flt3 in complex with STI571 (Fig. 4) not only renders such hydrogen bond impossible. The phenylalanine side chain would sterically interfere strongly with STI571 binding. That this is indeed the case was shown by mutating F691 in Flt3 to threonine. Both F691T Flt3 wildtype as well as F691T Flt3-ITD are sensitive to STI571 to a similar extent as PDGF -receptor. Vice versa, the PDGF -receptor T681F mutant is completely resistant to STI571 [130]. These findings highlight the importance of threonine 681 in the PDGF -receptor 5-strand for susceptibility to STI571 inhibition. Interestingly, in other studies the amino acid in the homologous position in other kinases has also been shown to have great influence on the sensitivity to kinase inhibitors. For BCR-Abl, STI571 resistant mutants occur in patients who chronically receive the drug [133-135]. Some

of these are T315I mutations [133]. Threonine 315 in Abl is homologous to threonine 681 in the PDGF -receptor and its replacement with isoleucine blocks STI571 in a similar manner as the phenylalanine in Flt3. Another example is pp60<sup>c-src</sup> kinase. The wildtype enzyme has a threonine (aa 338) in the homologous position and it is sensitive to the compound PP1 (AGL1872) [136, 137]. The oncogenic pp60<sup>v-src</sup> has isoleucine in this position and is not sensitive to PP1 [136]. Finally, it was demonstrated recently that the susceptibility of the EGF receptor to the very effective anilinoquinazoline inhibitor PD153035 can also be completely eliminated by mutating the homologous threonine (aa 766) to valine [138]. These studies have revealed some insight into the structural basis for kinase inhibitor selectivity. On the other hand, they may help the chemists to find novel inhibitors. For Flt3, other pharmacophores than the one of STI571 are obviously required. As the title of a recent review on this issue says, 'Finding the next Gleevec' is a current challenge [121].

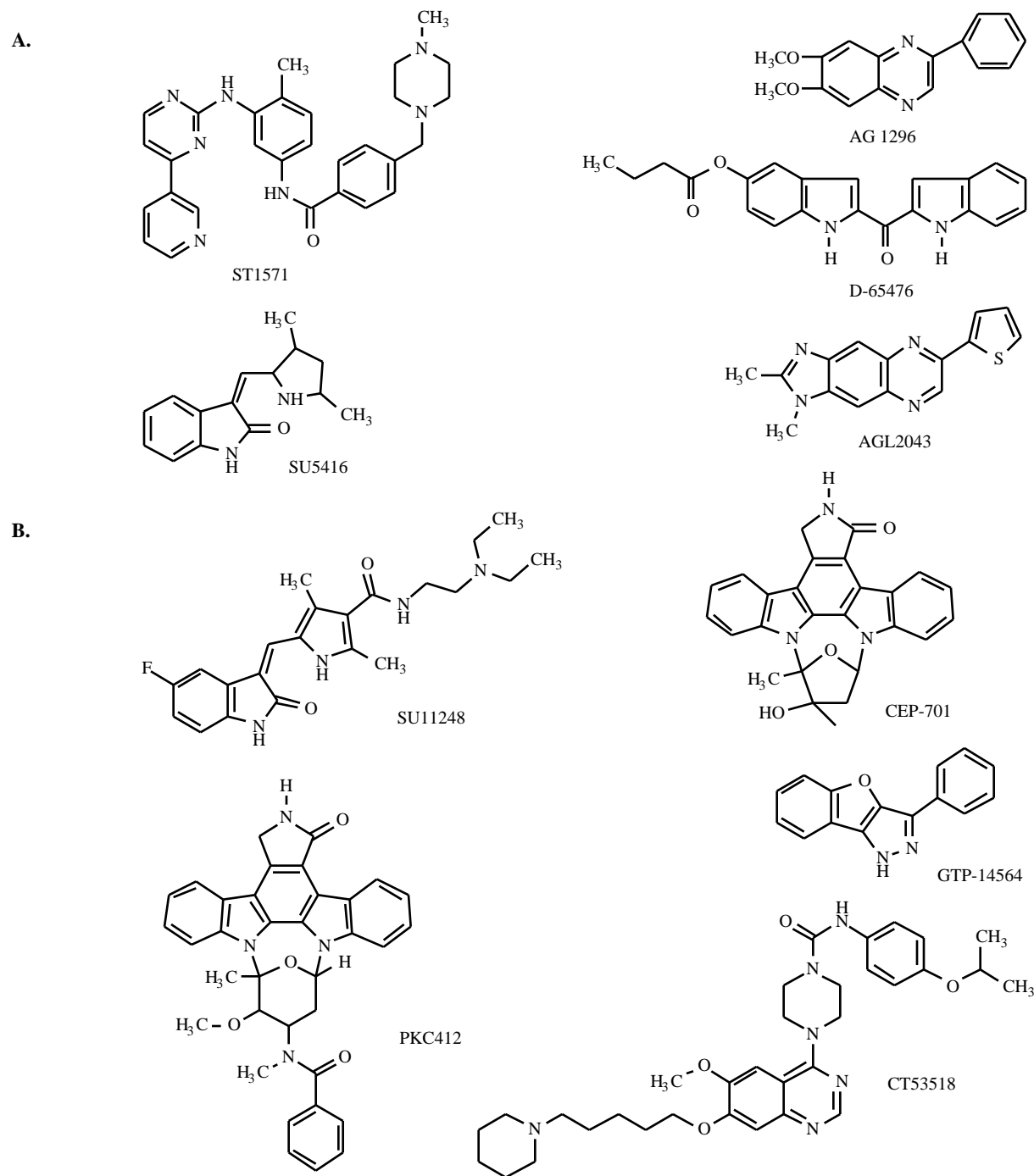
### 3.3. Flt3 Inhibitors from Different Structural Families

One promising pharmacophore has also been initially described in a series of PDGF receptor kinase inhibitors, the bis(1*H*-2-indolyl)-1-methanone moiety [139]. In this compound family, potent direct inhibitors of Flt3 kinase activity and signaling as well as of Flt3-dependent proliferation such as D-65476 were identified [140]. Importantly, the compounds also suppress the anti-apoptotic effect mediated by Flt-ITD and, under conditions of partial inhibition of Flt3-ITD, restore a signaling profile which resembles Flt3 wildtype [53]. Another inhibitor family for PDGF receptors, c-Kit, and Flt3 comprises tricyclic quinoxalines as AGL2043 [141] (Fig. 3a). Efficacy of both compound families *in vivo* has not yet been demonstrated.

Indolinones are another class of compounds which, depending on substitution, have efficacy on a wide variety of tyrosine kinases [142-144]. Previously, the compound SU5416 (Semaxanib) (Fig. 3a) from this series has been described to be a dual inhibitor of VEGF receptor-2 (KDR) and c-Kit kinases [142, 145], which does not inhibit PDGF receptors. However, the compound has also substantial efficacy in inhibiting Flt3 [146]. Based on its anti-angiogenic potency, SU5416 was already in phase II and phase III clinical trials and had a proven safety record in the clinic. Thus, it rapidly entered studies for the treatment of AML. Recently published first results demonstrate some biological, but little clinical efficacy, when SU5416 was used as a single drug [147, 148]. A more potent Flt3 inhibitor from the indolinone family is SU11248 (Fig. 3b). This compound has an IC<sub>50</sub> of 250 nM or 50 nM for Flt3 wildtype or Flt3-ITD in intact cells, respectively [149]. In addition, it inhibits PDGF receptors, the VEGF receptor-2/KDR, and c-Kit [150]. In preclinical tumor models using Flt3-ITD-expressing human leukemia cell lines, SU11248 induced regression of large, subcutaneous tumors and improved survival in a bone marrow engraftment model [149].

Another group of kinase inhibitors that holds promise for the treatment of AML consists of two classes of indolocarbazole derivatives. One group, exemplified by CEP-701 (Fig. 3b) was initially found as an inhibitor of the nerve-growth factor receptor TrkA [151-153]. Recently, CEP-701

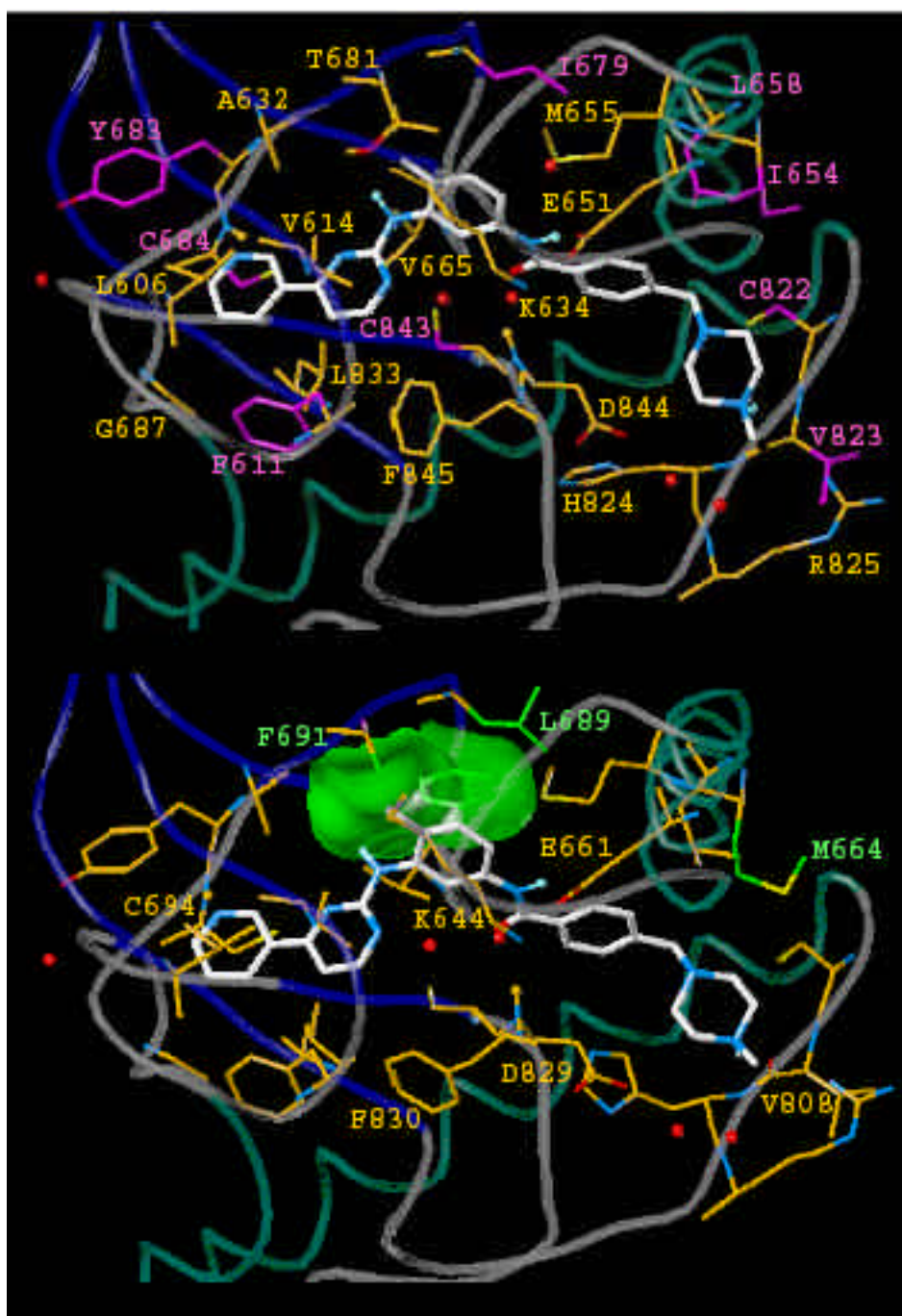




**Fig. (3). Chemical structures of different tyrosine kinase inhibitors.** For the respective references, see the text.

was demonstrated to potently inhibit Flt3 (IC<sub>50</sub> 2-3 nM) [154]. With lower potency, it also inhibits the VEGF receptor-2/KDR and PDGF receptors. As many indolocarbazoles, it has also potency against PKC isoenzymes. In Balb/c mice injected with Flt3-ITD expressing Ba/F3 cells, CEP-701 application led to prolonged survival [154]. Another compound from this family is PKC412 (Fig. 3b), which was initially described as a PKC inhibitor [155]. It is a moderate Flt3 inhibitor *in vitro* (IC<sub>50</sub> about 0.5 μM) but it has high potency in intact cells (IC<sub>50</sub> < 10 nM) [156]. The reason for this discrepancy is not known. Interestingly, PKC412 inhibits constitutively active forms of Flt3 [101, 156] but not wildtype Flt3. Besides Flt3 and PKC, PKC412 also inhibits

PDGF receptors, the VEGF receptor-2/KDR, and, with lower efficacy, c-Kit [155]. *In vivo* application of PKC412 strongly improved survival of mice with a myeloproliferative syndrome induced by transplantation of Flt3-ITD-transduced bone-marrow [156]. Very recently, a structurally somewhat related compound, GTP-14576 (Fig. 3b), has been described as a novel Flt3 inhibitor. It shares with PKC412 its selectivity for inhibiting Flt3-ITD-driven proliferation, albeit at significantly higher concentrations. Interestingly, however, the compound inhibits wildtype Flt3 and Flt3-ITD kinase activity equally well. As in case of PKC412, the reasons for the discrepancy in selectivity in the different assays are not known [31].



**Fig. (4). Models of STI571-binding to the PDGF  $\gamma$ -receptor kinase and Flt3.** Model of PDGF  $\gamma$ -receptor kinase STI-571 complex (upper panel; colors of transparent tubes: blue –  $\beta$ -strands, green –  $\alpha$ -helices, grey – loops.) and docking of STI571 into Flt3 derived from the model of the Flt3 F691T mutant STI-571 complex (lower panel). Green – mutated residues in Flt3 compared to PDGF  $\gamma$ -receptor kinase. The side-chain of Flt3 phenylalanine 691 is depicted in a space-filling representation (from [130] with permission of the publisher).

CT53518, another potent inhibitor of wildtype Flt3 and Flt3-ITD (IC<sub>50</sub> in intact cells 30-100 nM) derives from the piperazonyl quinazoline class [157]. It also inhibits PDGF receptors and c-Kit with similar efficacy but it is 15-20 times less effective against c-Fms/CSF-1 receptor. Treatment with CT53518 improved survival of mice in a Ba/F3 nude mouse model of Flt3-ITD-induced leukemia, and in a bone-marrow transplantation model of Flt3-ITD induced myeloproliferative disease [157].

An interesting aspect, which emerged in the study of the various Flt3 inhibitors was a frequently observed differential effect on Flt3 wildtype and on the activating mutations. For example, AG1296 apparently inhibited Flt3-ITD better than Flt3 wildtype [126], whereas Flt3-ITD and Flt3 I836del were inhibited equally well. The same compound did not have any activity towards Flt3 D835Y [101]. As stated above, PKC412 did not inhibit Flt3 wildtype [156], but inhibited catalytic domain mutants of Flt3 even better than Flt3-ITD

[101]. These findings implicate that the catalytic domain structures of Flt3 and different activated mutants are likely to be rather different. On the other hand, knowledge of the different activity profiles may be critical to choose the proper compound for treatment of a given patient. Another interesting aspect is the potency of several of the above-described compounds against the VEGF receptor-2/KDR. Bone-marrow angiogenesis has been associated with AML [158, 159], and targeting the angiogenesis via the side-reactivity against KDR may have additional beneficial effects. Finally, compounds from diverse structural families have efficacy for Flt3. If several of them turn out to be efficient in the clinic, there may be good options to treat resistances which are likely to occur in a similar manner as in the case of STI571 and Bcr-Abl. Since a number of compounds, including SU11248, CEP-701, PKC412, and CT53518 are currently in clinical trials, we will soon learn more about these and other aspects of targeting Flt3 with small molecules.

## CONCLUSIONS AND OUTLOOK

Over the last years, much progress has been made to define the role of Flt3 mutations in AML. We know their prevalence, clinical implications and their biological consequences on proliferation and survival of myeloid progenitor cells and leukemic blasts. The current knowledge puts them in a promising position. Flt3 mutations represent the most common genetic aberration in AML, and their primary consequence, constitutive activation of a tyrosine kinase, can be effectively targeted by several compounds that have been developed for other purposes and further, specifically tailored compounds may follow. However, several problems remain to be solved:

We do not yet know, whether the different Flt3 mutations and the relative expression levels of mutant versus wildtype receptor have different biological consequences in AML blasts. Moreover, since Flt3 has been described to have important functions in antitumor immunity, it is not clear, whether inhibition of wildtype Flt3, a likely side effect of many compounds, in clinical situations is always without any harm.

Much more work will be necessary to dissect the signal transduction events involved in the different classes of Flt3 mutations. The molecular basis for the qualitatively different signal transduction that has already been observed between signals from ligand-activated wildtype receptors and receptors activated by Flt3-ITD needs to be defined. How do the mutations influence receptor localization, processing, stability, and its interaction with signaling molecules? Such knowledge will lead to better understanding of the signaling pathways involved in leukemic transformation and might allow to target events downstream of Flt3 mutations, but not of wildtype Flt3.

A further potential problem is the lack of specificity of most tyrosine kinase inhibitors that are currently tested for targeting Flt3. Is this going to be a favorable or an unfavorable feature of the compounds? As long as the therapeutic implications of their anti-angiogenic or broad anti-hematopoietic characteristics in AML patients are not known, we will learn most about the role of Flt3 in AML pathophysiology from the most selective agents. However, a

multimodality approach, targeting several tyrosine kinases of potential importance for AML maintenance with one compound might prove to be clinically more powerful.

Flt3 mutations cause a myeloproliferative disease in primary mouse cells. The full feature of AML requires additional, cooperating oncogenes. Although many possible cooperation partners are described, little is known about the nature of such cooperating events. Most importantly, it is not clear whether the function of Flt3 mutations is necessary for the maintenance of the leukemic phenotype, or whether it only plays a role in its initiation. An attractive idea to tackle AML would be to separately target the different events that contribute to the leukemic phenotype by a combination of drugs. Such a combination may or may not contain Flt3 inhibitors.

Much of the enthusiasm about Flt3-mutations as a molecular target in AML has been spurred by the exceptional success of Gleevec/Imatinib in the treatment of CML. Although we all hope that a similar development for AML will provide a major contribution against this deadly disease, some scepticism is warranted towards the expectation that an Flt3-inhibitor in AML could be 'another Gleevec', with high durable remission rates if applied as a monotherapy. CML is – at least in the chronic phase, where Gleevec shows the most promising results – driven exclusively by Bcr-Abl. As described above, AML is driven by a more complex process that depends on several cooperating oncogenic pathways, and its dependence on continuous Flt3 signals has not been shown. Also, chronic phase CML is a pre-malignant condition, whereas AML is a fully malignant disease, more comparable to CML blast crisis that almost uniformly relapses, even if it is initially successfully treated with Gleevec/Imatinib. Therefore, it is highly important that clinical trials with tyrosine kinase inhibitors that target Flt3 are carefully designed. Hopefully, we will know after their completion whether Flt3 was successfully targeted in the patient and whether the compounds induce biological effects in AML blasts. This would then justify further development of these compounds as parts of a drug combination – either with cytotoxic drugs or with other selectively targeted therapies. Even if the remission rates should be disappointing, we will learn very much about the compounds, the target, and the disease from carefully designed clinical trials.

One result that can be anticipated almost with certainty is the development of secondary resistance to Flt3 inhibitors, either by mechanisms involving molecular resistance of Flt3 or by events that render AML blasts independent from Flt3 signals. It will be important to be prepared for this development by collecting knowledge about the structural basis for the described striking differences of compounds in their interaction with various mutants and by developing animal models that allow faithful simulation of resistance development.

Even if only some compounds are successful in the clinic – a large repertoire of novel molecular probes for Flt3 biology and signaling mechanisms is likely to emerge from the described investigations. Some of the compounds have already been exploited to demonstrate the existence of autocrine loops in myeloid leukemia cell lines such as EOL-1 [154], the role of Flt3-ITD in suppression of differentiation

[112] and in maintaining a transformation-specific gene expression profile [53].

Flt3-mutations have gathered tremendous attraction from scientists, the medical community, and from pharmaceutical companies. With joint efforts involving basic sciences, compound design, studies in animal models, and clinical studies, they pose a great chance to profoundly change AML treatment, which is not to be missed.

## ACKNOWLEDGMENTS

Work in the laboratory of F.D.B. is supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB604/A1, BO1043-4), the Deutsche Krebshilfe, and the BMBF (grant 01EA0103). The work of H.S is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Se 600-2, SFB 293), the IZKF Münster (Project H4), the Deutsche Jose-Carreras Leukämie-Stiftung and the Wilhelm-Sander-Foundation. We are grateful to Mrs. A. Uecker for excellent technical assistance and critical reading of the manuscript.

## ABBREVIATIONS

ALL	=	Acute lymphocytic leukemia
AML	=	Acute myeloid leukemia
APL	=	Acute promyelocytic leukemia
CML	=	Chronic myeloid leukemia
FAB		
classification	=	French-American-British group classification
FL	=	Flt3 ligand
ITD	=	Internal tandem duplication
MAP-Kinase	=	Mitogen-activated protein kinase
MDS	=	Myelodysplastic syndrome
PDGF	=	Platelet-derived growth factor
PI3K	=	Phosphoinositide-3 kinase
PTP	=	Protein-tyrosine phosphatase
RTK	=	Receptor tyrosine kinase
STAT	=	Signal transducer and activator of transcription

## REFERENCES

- [1] Druker BJ. Imatinib mesylate in the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Expert Opin Pharmacother* 2003; 4: 963-71.
- [2] Mauro MJ, O'Dwyer M, Heinrich MC, Druker BJ. STI571: A paradigm of new agents for cancer therapeutics. *J Clin Oncol* 2002; 20: 325-34.
- [3] Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 493-502.
- [4] Sjöblom T, Shimizu A, O'Brien KP, Pietras K, Dal Cin P, Buchdunger E, *et al.* Growth inhibition of dermatofibrosarcoma protuberans tumors by the platelet-derived growth factor receptor antagonist sti571 through induction of apoptosis. *Cancer Res* 2001; 61: 5778-83.
- [5] Rosnet O, Marchetto S, deLapeyriere O, Birnbaum D. Murine flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the pdgfr/csf1r family. *Oncogene* 1991; 6: 1641-50.
- [6] Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ, Marchetto S, Tonnelle C, Toiron Y, *et al.* Human flt3/flk2 gene: Cdna cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 1993; 82: 1110-9.
- [7] Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* 1991; 65: 1143-52.
- [8] Small D, Levenstein M, Kim E, Carow C, Amin S, Rockwell P, *et al.* Stk-1, the human homolog of flk-2/flt-3, is selectively expressed in cd34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 459-63.
- [9] Carow CE, Kim E, Hawkins AL, Webb HD, Griffin CA, Jabs EW, *et al.* Localization of the human stem cell tyrosine kinase-1 gene (flt3) to 13q12-->q13. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 70: 255-7.
- [10] Rosnet O, Stephenson D, Mattei MG, Marchetto S, Shibuya M, Chapman VM, *et al.* Close physical linkage of the flt1 and flt3 genes on chromosome 13 in man and chromosome 5 in mouse. *Oncogene* 1993; 8: 173-9.
- [11] Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Genomic structure of human flt3: Implications for mutational analysis. *Br J Haematol* 2001; 113: 1076-7.
- [12] Lavagna C, Marchetto S, Birnbaum D, Rosnet O. Identification and characterization of a functional murine Flt3 isoform produced by exon skipping. *J Biol Chem* 1995; 270: 3165-71.
- [13] Lyman SD, James L, Zappone J, Sleath PR, Beckmann MP, Bird T. Characterization of the protein encoded by the flt3 (flk2) receptor-like tyrosine kinase gene. *Oncogene* 1993; 8: 815-22.
- [14] Maroc N, Rottapel R, Rosnet O, Marchetto S, Lavezzi C, Mannoni P, *et al.* Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the Flt3/Flk2 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1993; 8: 909-18.
- [15] Brazel CY, Ducceschi MH, Pytowski B, Levison SW. The Flt3 tyrosine kinase receptor inhibits neural stem/progenitor cell proliferation and collaborates with NGF to promote neuronal survival. *Mol Cell Neurosci* 2001; 18: 381-93.
- [16] Mitton KP, Swain PK, Khanna H, Dowd M, Apel II, Swaroop A. Interaction of retinal bzip transcription factor NRL with Flt3-interacting zinc-finger protein Fiz1: Possible role of Fiz1 as a transcriptional repressor. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 365-73.
- [17] Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Astrand-Grundstrom I, Sitnicka E, *et al.* Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow lin(-)scal(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* 2001; 15: 659-69.
- [18] Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: A simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 14541-6.
- [19] Rappold I, Ziegler BL, Kohler I, Marchetto S, Rosnet O, Birnbaum D, *et al.* Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing Flt3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood* 1997; 90: 111-25.
- [20] Lyman SD, Jacobsen SE. C-Kit ligand and Flt3 ligand: Stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998; 91: 1101-34.
- [21] Graeber TG, Shuai K. Rapid gene repression triggered by interleukin-6 at the onset of monocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 863-9.
- [22] Mackaretschian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* 1995; 3: 147-61.
- [23] Lyman SD, James L, Escobar S, Downey H, de Vries P, Brasel K, *et al.* Identification of soluble and membrane-bound isoforms of the murine Flt3 ligand generated by alternative splicing of mRNAs. *Oncogene* 1995; 10: 149-57.
- [24] Savvides SN, Boone T, Andrew Karplus P. Flt3 ligand structure and unexpected commonalities of helical bundles and cystine knots. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 486-91.
- [25] Lyman SD, James L, Johnson L, Brasel K, de Vries P, Escobar SS, *et al.* Cloning of the human homologue of the murine Flt3 ligand: A growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1994; 83: 2795-801.
- [26] Lisovsky M, Braun SE, Ge Y, Takahira H, Lu L, Savchenko VG, *et al.* Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells. *Leukemia* 1996; 10: 1012-8.

- [27] Peters M, Solem F, Goldschmidt J, Schirmacher P, Rose-John S. Interleukin-6 and the soluble interleukin-6 receptor induce stem cell factor and flt-3l expression in vivo and in vitro. *Exp Hematol* 2001; 29: 146-55.
- [28] McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, *et al.* Mice lacking Flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 2000; 95: 3489-97.
- [29] Dosil M, Wang S, Lemischka IR. Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 6572-85.
- [30] Zhang S, Fukuda S, Lee Y, Hangoc G, Cooper S, Spolski R, *et al.* Essential role of signal transducer and activator of transcription (stat)5a but not stat5b for Flt3-dependent signaling. *J Exp Med* 2000; 192: 719-28.
- [31] Murata K, Kumagai H, Kawashima T, Tamatsu K, Irie M, Nakajima H, *et al.* Selective cytotoxic mechanism of GTP-14564, a novel tyrosine kinase inhibitor in leukemia cells expressing a constitutively active Flt3. *J Biol Chem* 2003; 18: 18.
- [32] Marchetto S, Fournier E, Beslu N, Aurran-Schleinitz T, Dubreuil P, Borg JP, *et al.* Shc and ship phosphorylation and interaction in response to activation of the Flt3 receptor. *Leukemia* 1999; 13: 1374-82.
- [33] Bustelo XR. Regulatory and signaling properties of the VAV family. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 1461-77.
- [34] Rottapel R, Turck CW, Casteran N, Liu X, Birnbaum D, Pawson T, *et al.* Substrate specificities and identification of a putative binding site for PI3K in the carboxy tail of the murine Flt3 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1994; 9: 1755-65.
- [35] Beslu N, LaRose J, Casteran N, Birnbaum D, Lecocq E, Dubreuil P, *et al.* Phosphatidylinositol-3' kinase is not required for mitogenesis or internalization of the Flt3/Flk2 receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1996; 271: 20075-81.
- [36] Zhang S, Broxmeyer HE. Flt3 ligand induces tyrosine phosphorylation of Gab1 and Gab2 and their association with SHP-2, Grb2, and PI3 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277: 195-9.
- [37] Zhang S, Broxmeyer HE. P85 subunit of PI3 kinase does not bind to human Flt3 receptor, but associates with SHP2, SHIP, and a tyrosine-phosphorylated 100-kda protein in Flt3 ligand-stimulated hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 440-5.
- [38] Zhang S, Mantel C, Broxmeyer HE. Flt3 signaling involves tyrosyl-phosphorylation of SHP-2 and SHIP and their association with Grb2 and SHC in BAF3/Flt3 cells. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 372-80.
- [39] Nishida K, Yoshida Y, Itoh M, Fukada T, Ohtani T, Shirogane T, *et al.* Gab-family adapter proteins act downstream of cytokine and growth factor receptors and T- and B-cell antigen receptors. *Blood* 1999; 93: 1809-16.
- [40] Zhao C, Yu DH, Shen R, Feng GS. Gab2, a new pleckstrin homology domain-containing adapter protein, acts to uncouple signaling from Erk kinase to Elk-1. *J Biol Chem* 1999; 274: 19649-54.
- [41] Miyake S, Lupher ML, Jr., Druker B, Band H. The tyrosine kinase regulator Cbl enhances the ubiquitination and degradation of the platelet-derived growth factor receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 7927-32.
- [42] Miyake S, Mullane-Robinson KP, Lill NL, Douillard P, Band H. Cbl-mediated negative regulation of platelet-derived growth factor receptor-dependent cell proliferation. A critical role for Cbl tyrosine kinase-binding domain. *J Biol Chem* 1999; 274: 16619-28.
- [43] Soubeyran P, Kowanetz K, Szymkiewicz I, Langdon WY, Dikic I. Cbl-Cin85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* 2002; 416: 183-7.
- [44] Fang D, Wang HY, Fang N, Altman Y, Elly C, Liu YC. Cbl-B, a ring-type E3 ubiquitin ligase, targets phosphatidylinositol 3-kinase for ubiquitination in T cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 4872-8.
- [45] Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP, Dikic I. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 461-6.
- [46] Lavagna-Sevenier C, Marchetto S, Birnbaum D, Rosnet O. The Cbl-related protein CblB participates in Flt3 and interleukin-7 receptor signal transduction in pro-B cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 14962-7.
- [47] Lavagna-Sevenier C, Marchetto S, Birnbaum D, Rosnet O. Flt3 signaling in hematopoietic cells involves Cbl, SHC and an unknown p115 as prominent tyrosine-phosphorylated substrates. *Leukemia* 1998; 12: 301-10.
- [48] Östman A, Böhmer FD. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 258-66.
- [49] Lisovsky M, Estrov Z, Zhang X, Consoli U, Sanchez-Williams G, Snell V, *et al.* Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: Regulation of Bcl-2 and Bax. *Blood* 1996; 88: 3987-97.
- [50] Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME. The many forks in Foxo's road. *Sci STKE* 2003; 2003: RE5.
- [51] Burgering BM, Medema RH. Decisions on life and death: Foxo forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 689-701.
- [52] Minami Y, Yamamoto K, Kiyoi H, Ueda R, Saito H, Naoe T. Different anti-apoptotic pathways between wild-type and mutated Flt3: Insights into therapeutic targets in leukemia. *Blood* 2003.
- [53] Mizuki M, Schwäble J, Steur C, Choudhary C, Agrawal S, Sargin B, *et al.* Suppression of myeloid transcription factors and induction of Stat response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood* 2003; 101: 3164-73.
- [54] Solanilla A, Grosset C, Duche P, Legembre P, Pitard V, Dupouy M, *et al.* Flt3-ligand induces adhesion of haematopoietic progenitor cells via a very late antigen (VLA)-4- and VLA-5-dependent mechanism. *Br J Haematol* 2003; 120: 782-6.
- [55] Wolf I, Rohrschneider LR. Fzl1, a novel zinc finger protein interacting with the receptor tyrosine kinase Flt3. *J Biol Chem* 1999; 274: 21478-84.
- [56] Birg F, Courcoult M, Rosnet O, Bardin F, Pebusque MJ, Marchetto S, *et al.* Expression of the fms/kit-like gene flt3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood* 1992; 80: 2584-93.
- [57] Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH, Chen J, Amin S, Rockwell P, *et al.* Expression of the hematopoietic growth factor receptor Flt3 (Stk-1/Flk2) in human leukemias. *Blood* 1996; 87: 1089-96.
- [58] Stacchini A, Fubini L, Severino A, Sanavio F, Aglietta M, Piacibello W. Expression of type iii receptor tyrosine kinases Flt3 and kit and responses to their ligands by acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia* 1996; 10: 1584-91.
- [59] Rosnet O, Buhning HJ, Marchetto S, Rappold I, Lavagna C, Sainty D, *et al.* Human Flt3/Flk2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia* 1996; 10: 238-48.
- [60] Drexler HG. Expression of flt3 receptor and response to Flt3 ligand by leukemic cells. *Leukemia* 1996; 10: 588-99.
- [61] Piacibello W, Fubini L, Sanavio F, Brizzi MF, Severino A, Garetto L, *et al.* Effects of human Flt3 ligand on myeloid leukemia cell growth: Heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood* 1995; 86: 4105-14.
- [62] Serve H, Flesch K, Serve S, Fenski R, Berdel WE. Expression and function of Flt3/Flk2 in human tumor cell lines. *Int J Oncol* 1999; 14: 765-70.
- [63] Meierhoff G, Dehmel U, Gruss HJ, Rosnet O, Birnbaum D, Quentmeier H, *et al.* Expression of Flt3 receptor and Flt3-ligand in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* 1995; 9: 1368-72.
- [64] Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, *et al.* Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1911-8.
- [65] Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, *et al.* Internal tandem duplication of the flt3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 1998; 12: 1333-7.
- [66] Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Rees DC, *et al.* Flt3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol* 2000; 111: 190-5.
- [67] Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, Iwai T, Misawa S, Okuda T, *et al.* Internal tandem duplication of the flt3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia* 1997; 11: 1605-9.
- [68] Xu F, Taki T, Yang HW, Hanada R, Hongo T, Ohnishi H, *et al.* Tandem duplication of the flt3 gene is found in acute lymphoblastic

- leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children. *Br J Haematol* 1999; 105: 155-62.
- [69] Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, *et al.* Prognostic implication of flt3 and N-ras gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 93: 3074-80.
- [70] Frohling S, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, *et al.* Prognostic significance of activating flt3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: A study of the AML study group Ulm. *Blood* 2002; 100: 4372-80.
- [71] Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, *et al.* Analysis of flt3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: Correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002; 100: 59-66.
- [72] Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, *et al.* Analysis of flt3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: Association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002; 99: 4326-35.
- [73] Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, *et al.* The presence of a flt3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: Analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001; 98: 1752-9.
- [74] Kainz B, Heintel D, Marculescu R, Schwarzwinger I, Sperr W, Le T, *et al.* Variable prognostic value of flt3 internal tandem duplications in patients with de novo AML and a normal karyotype, t(15;17), t(8;21) or inv(16). *Hematol J* 2002; 3: 283-9.
- [75] Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, *et al.* Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of flt3: A cancer and leukemia group B study. *Cancer Res* 2001; 61: 7233-9.
- [76] Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Appelbaum FR, Slovak ML, Willman CL, *et al.* Flt3, ras, and tp53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97: 3589-95.
- [77] Boissel N, Cayuela JM, Preudhomme C, Thomas X, Grardel N, Fund X, *et al.* Prognostic significance of Flt3 internal tandem repeat in patients with de novo acute myeloid leukemia treated with reinforced courses of chemotherapy. *Leukemia* 2002; 16: 1699-704.
- [78] Moreno I, Martin G, Bolufer P, Barragan E, Rueda E, Roman J, *et al.* Incidence and prognostic value of flt3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2003; 88: 19-24.
- [79] Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Identification of novel flt-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 113: 983-8.
- [80] Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, Nakao M, Minami S, Kuriyama K, *et al.* Internal tandem duplication of flt3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia study group of the ministry of health and welfare (KOHSEISHO)*. *Leukemia* 1997; 11: 1447-52.
- [81] Iwai T, Yokota S, Nakao M, Okamoto T, Taniwaki M, Onodera N, *et al.* Internal tandem duplication of the flt3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The children's cancer and leukemia study group, Japan. *Leukemia* 1999; 13: 38-43.
- [82] Kondo M, Horibe K, Takahashi Y, Matsumoto K, Fukuda M, Inaba J, *et al.* Prognostic value of internal tandem duplication of the flt3 gene in childhood acute myelogenous leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1999; 33: 525-9.
- [83] Liang DC, Shih LY, Hung IJ, Yang CP, Chen SH, Jaing TH, *et al.* Flt3-TKD mutation in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003; 17: 883-6.
- [84] Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA, Zhang Q, Sweetser DA, Woods WG, *et al.* Activating mutations of RTK/Ras signal transduction pathway in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2003.
- [85] Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, Sweetser DA, Buckley JD, Tjoa TK, *et al.* Prevalence and prognostic significance of flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97: 89-94.
- [86] Liang DC, Shih LY, Hung IJ, Yang CP, Chen SH, Jaing TH, *et al.* Clinical relevance of internal tandem duplication of the flt3 gene in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer* 2002; 94: 3292-8.
- [87] Fenaux P. Chromosome and molecular abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol* 2001; 73: 429-37.
- [88] Horiike S, Yokota S, Nakao M, Iwai T, Sasai Y, Kaneko H, *et al.* Tandem duplications of the Flt3 receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia. *Leukemia* 1997; 11: 1442-6.
- [89] Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, Frew ME, Bowen DT, Linch DC. Studies of flt3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: Implications for the role of flt3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with Flt3 inhibitors. *Blood* 2002; 100: 2393-8.
- [90] Shih LY, Huang CF, Wu JH, Lin TL, Dunn P, Wang PN, *et al.* Internal tandem duplication of flt3 in relapsed acute myeloid leukemia: A comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood* 2002; 100: 2387-92.
- [91] Nakano Y, Kiyoi H, Miyawaki S, Asou N, Ohno R, Saito H, *et al.* Molecular evolution of acute myeloid leukaemia in relapse: Unstable N-ras and flt3 genes compared with p53 gene. *Br J Haematol* 1999; 104: 659-64.
- [92] Hovland R, Gjertsen BT, Bruserud O. Acute myelogenous leukemia with internal tandem duplication of the flt3 gene appearing or altering at the time of relapse: A report of two cases. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 2027-9.
- [93] Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Müller C, *et al.* Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and Stat5 pathways. *Blood* 2000; 96: 3907-14.
- [94] Tse KF, Mukherjee G, Small D. Constitutive activation of Flt3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. *Leukemia* 2000; 14: 1766-76.
- [95] Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG. Flt3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2002; 99: 310-8.
- [96] Kelly LM, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Amaral SM, Curley DP, *et al.* PML/RARalpha and Flt3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8283-8.
- [97] Hubbard SR. Autoinhibitory mechanisms in receptor tyrosine kinases. *Front Biosci* 2002; 7: D330-40.
- [98] Huse M, Kuriyan J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 2002; 109: 275-82.
- [99] Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Koderia Y, Miyawaki S, *et al.* Activating mutation of D835 within the activation loop of Flt3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; 97: 2434-9.
- [100] Spiekermann K, Bagrintseva K, Schoch C, Haferlach T, Hiddemann W, Schnittger S. A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the flt3 gene in acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; 100: 3423-5.
- [101] Grundler R, Thiede C, Miething C, Steudel C, Peschel C, Duyster J. Sensitivity towards tyrosine kinase inhibitors varies between different activating mutations of the Flt3 receptor. *Blood* 2003; 27: 27.
- [102] Armstrong SA, Kung AL, Mabon ME, Silverman LB, Stam RW, Den Boer ML, *et al.* Inhibition of Flt3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer Cell* 2003; 3: 173-83.
- [103] Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, *et al.* MLLtranslocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002; 30: 41-7.
- [104] Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H, Naoe T. Mechanism of constitutive activation of Flt3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene* 2002; 21: 2555-63.
- [105] Moskaluk CA, Tian Q, Marshall CR, Rumpel CA, Franquemont DW, Frierson HF, Jr. Mutations of c-Kit JM domain are found in a minority of human gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 1999; 18: 1897-902.

- [106] Tsujimura T, Morimoto M, Hashimoto K, Moriyama Y, Kitayama H, Matsuzawa Y, *et al.* Constitutive activation of c-Kit in FMA3 murine mastocytoma cells caused by deletion of seven amino acids at the juxtamembrane domain. *Blood* 1996; 87: 273-83.
- [107] Chan PM, Ilangumaran S, La Rose J, Chakrabarty A, Rottapel R. Autoinhibition of the Kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 3067-78.
- [108] Wybenga-Groot LE, Baskin B, Ong SH, Tong J, Pawson T, Sicheri F. Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region. *Cell* 2001; 106: 745-57.
- [109] Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001; 411: 355-65.
- [110] Fenski R, Flesch K, Serve S, Mizuki M, Oelmann E, Kratz-Albers K, *et al.* Constitutive activation of Flt3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32d cells. *Br J Haematol* 2000; 108: 322-30.
- [111] Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, *et al.* Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates Stat5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 2000; 19: 624-31.
- [112] Zheng R, Friedman AD, Small D. Targeted inhibition of Flt3 overcomes the block to myeloid differentiation in 32Dcl3 cells caused by expression of Flt3/ITD mutations. *Blood* 2002; 100: 4154-61.
- [113] Levitzki A, Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: An approach to drug development. *Science* 1995; 267: 1782-8.
- [114] Traxler P, Bold G, Buchdunger E, Caravatti G, Furet P, Manley P, *et al.* Tyrosine kinase inhibitors: From rational design to clinical trials. *Med Res Rev* 2001; 21: 499-512.
- [115] Nakamura H, Iitaka Y, Imoto M, Isshiki K, Naganawa H, Takeuchi T, *et al.* The structure of an epidermal growth factor-receptor kinase inhibitor, erlotinib. *J Antibiot (Tokyo)* 1986; 39: 314-5.
- [116] Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, *et al.* Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 1987; 262: 5592-5.
- [117] Yaish P, Gazit A, Gilon C, Levitzki A. Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science* 1988; 242: 933-5.
- [118] Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, Buchdunger E, Zimmermann J, Lydon NB, *et al.* CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing Bcr-Abl, TEL-Abl, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood* 1997; 90: 4947-52.
- [119] Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, *et al.* Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-Kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 139-45.
- [120] Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG, Griffin JD. ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood* 2001; 97: 2440-8.
- [121] Sawyers CL. Finding the next gleevec: Flt3 targeted kinase inhibitor therapy for acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002; 1: 413-5.
- [122] Zhao M, Kiyoi H, Yamamoto Y, Ito M, Towatari M, Omura S, *et al.* In vivo treatment of mutant Flt3-transformed murine leukemia with a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia* 2000; 14: 374-8.
- [123] Murakami Y, Mizuno S, Hori M, Uehara Y. Reversal of transformed phenotypes by herbimycin A in src oncogene expressed rat fibroblasts. *Cancer Res* 1988; 48: 1587-90.
- [124] Minami Y, Kiyoi H, Yamamoto Y, Yamamoto K, Ueda R, Saito H, *et al.* Selective apoptosis of tandemly duplicated Flt3-transformed leukemia cells by Hsp90 inhibitors. *Leukemia* 2002; 16: 1535-40.
- [125] Tse KF, Novelli E, Civin CI, Böhmer FD, Small D. Inhibition of Flt3-mediated transformation by use of a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia* 2001; 15: 1001-10.
- [126] Levis M, Tse KF, Smith BD, Garrett E, Small D. A Flt3 tyrosine kinase inhibitor is selectively cytotoxic to acute myeloid leukemia blasts harboring flt3 internal tandem duplication mutations. *Blood* 2001; 98: 885-7.
- [127] Kovalenko M, Gazit A, Böhmer A, Rorsman C, Rönnstrand L, Heldin CH, *et al.* Selective platelet-derived growth factor receptor kinase blockers reverse *sis*-transformation. *Cancer Res* 1994; 54: 6106-14.
- [128] Kovalenko M, Rönnstrand L, Heldin CH, Loubtchenkov M, Gazit A, Levitzki A, *et al.* Phosphorylation site-specific inhibition of platelet-derived growth factor beta-receptor autophosphorylation by the receptor blocking tyrphostin AG1296. *Biochemistry* 1997; 36: 6260-9.
- [129] Lipson KE, Pang L, Huber LJ, Chen H, Tsai JM, Hirth P, *et al.* Inhibition of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor receptor signaling events after treatment of cells with specific synthetic inhibitors of tyrosine kinase phosphorylation. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285: 844-52.
- [130] Böhmer FD, Karagyzov L, Uecker A, Serve H, Botzki A, Mahboobi S, *et al.* A single amino acid exchange inverts susceptibility of related receptor tyrosine kinases for the ATP site inhibitor STI-571. *J Biol Chem* 2003; 278: 5148-55.
- [131] Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 2000; 289: 1938-42.
- [132] Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, *et al.* Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res* 2002; 62: 4236-43.
- [133] Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, *et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by Bcr-Abl gene mutation or amplification. *Science* 2001; 293: 876-80.
- [134] Hochhaus A. Cytogenetic and molecular mechanisms of resistance to imatinib. *Semin Hematol* 2003; 40: 69-79.
- [135] Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, *et al.* Multiple Bcr-Abl kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002; 2: 117-25.
- [136] Liu Y, Bishop A, Witucki L, Kraybill B, Shimizu E, Tsien J, *et al.* Structural basis for selective inhibition of Src family kinases by PP1. *Chem Biol* 1999; 6: 671-8.
- [137] Waltenberger J, Uecker A, Kroll J, Frank H, Mayr U, Bjorge JD, *et al.* A dual inhibitor of platelet-derived growth factor beta-receptor and Src kinase activity potentially interferes with mitogenic and mitogenic responses to PDGF in vascular smooth muscle cells. A novel candidate for prevention of vascular remodeling. *Circ Res* 1999; 85: 12-22.
- [138] Blencke S, Ullrich A, Daub H. Mutation of threonine 766 in the epidermal growth factor receptor reveals a hotspot for resistance formation against selective tyrosine kinase inhibitors. *J Biol Chem* 2003; 278: 15435-40.
- [139] Mahboobi S, Teller S, Pongratz H, Hufsky H, Sellmer A, Botzki A, *et al.* Bis(1h-2-indolyl)methanones as a novel class of inhibitors of the platelet-derived growth factor receptor kinase. *J Med Chem* 2002; 45: 1002-18.
- [140] Teller S, Krämer D, Böhmer SA, Tse KF, Small D, Mahboobi S, *et al.* Bis(1h-2-indolyl)-1-methanones as inhibitors of the hematopoietic tyrosine kinase Flt3. *Leukemia* 2002; 16: 1528-34.
- [141] Gazit A, Yee K, Uecker A, Böhmer FD, Sjöblom T, Östman A, *et al.* Tricyclic quinoxalines as potent kinase inhibitors of PDGFR kinase, Flt3 and Kit. *Bioorg Med Chem* 2003; 11: 2007-18.
- [142] Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, *et al.* SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 1999; 59: 99-106.
- [143] Yamasaki Y, Miyoshi K, Oda N, Watanabe M, Miyake H, Chan J, *et al.* Weekly dosing with the platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor SU9518 significantly inhibits arterial stenosis. *Circ Res* 2001; 88: 630-6.
- [144] Liao AT, Chien MB, Shenoy N, Mendel DB, McMahon G, Cherrington JM, *et al.* Inhibition of constitutively active forms of mutant kit by multitargeted indolinone tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2002; 100: 585-93.
- [145] Smolich BD, Yuen HA, West KA, Giles FJ, Albitar M, Cherrington JM. The antiangiogenic protein kinase inhibitors SU5416 and SU6668 inhibit the SCF receptor (c-Kit) in a human myeloid leukemia cell line and in acute myeloid leukemia blasts. *Blood* 2001; 97: 1413-21.
- [146] Yee KW, O'Farrell AM, Smolich BD, Cherrington JM, McMahon G, Wait CL, *et al.* SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant Flt3 receptor tyrosine kinase. *Blood* 2002; 100: 2941-9.
- [147] Giles FJ, Stopeck AT, Silverman LR, Lancet JE, Cooper MA, Hannah AL, *et al.* SU5416, a small molecule tyrosine kinase



- receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Blood* 2003; 20: 20.
- [148] Fiedler W, Mesters R, Tinnefeld H, Loges S, Staib P, Duhrsen U, *et al.* A phase ii clinical study of SU5416 in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 2003; 3: 3.
- [149] O'Farrell AM, Abrams TJ, Yuen HA, Ngai TJ, Louie SG, Yee KW, *et al.* Su11248 is a novel flt3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood* 2003; 101: 3597-605.
- [150] Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, *et al.* In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: Determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 327-37.
- [151] Miknyoczki SJ, Chang H, Klein-Szanto A, Dionne CA, Ruggeri BA. The Trk tyrosine kinase inhibitor CEP-701 (KT-5555) exhibits significant antitumor efficacy in preclinical xenograft models of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2205-12.
- [152] Miknyoczki SJ, Dionne CA, Klein-Szanto AJ, Ruggeri BA. The novel Trk receptor tyrosine kinase inhibitor CEP-701 (KT-5555) exhibits antitumor efficacy against human pancreatic carcinoma (Panc1) xenograft growth and in vivo invasiveness. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 880: 252-62.
- [153] George DJ, Dionne CA, Jani J, Angeles T, Murakata C, Lamb J, *et al.* Sustained in vivo regression of dunning h rat prostate cancers treated with combinations of androgen ablation and Trk tyrosine kinase inhibitors, CEP-751 (KT-6587) or CEP-701 (KT-5555). *Cancer Res* 1999; 59: 2395-401.
- [154] Levis M, Allebach J, Tse KF, Zheng R, Baldwin BR, Smith BD, *et al.* A Flt3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* 2002; 99: 3885-91.
- [155] Fabbro D, Ruetz S, Bodis S, Pruschy M, Csermak K, Man A, *et al.* PKC412--a protein kinase inhibitor with a broad therapeutic potential. *Anticancer Drug Des* 2000; 15: 17-28.
- [156] Weisberg E, Boulton C, Kelly LM, Manley P, Fabbro D, Meyer T, *et al.* Inhibition of mutant Flt3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell* 2002; 1: 433-43.
- [157] Kelly LM, Yu JC, Boulton CL, Apatira M, Li J, Sullivan CM, *et al.* CT53518, a novel selective F lt3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). *Cancer Cell* 2002; 1: 421-32.
- [158] Verstovsek S, Estey E, Manshouri T, Giles FJ, Cortes J, Beran M, *et al.* Clinical relevance of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2002; 118: 151-6.
- [159] Padro T, Bieker R, Ruiz S, Steins M, Retzlaff S, Burger H, *et al.* Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its cellular receptor KDR (VEGFR-2) in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 1302-10.